

Aus dem
Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg/Saar
Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Klinikdirektor: Prof. Dr. D. Fliser

**Fibroblast Growth Factor 23,
nicht jedoch lösliches Klotho, prädiziert
akute kardiale Dekompensationen und Mortalität
bei chronischer Nierenerkrankung**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2015

vorgelegt von
Stefan Neuhaus
geboren am 18.04.1983 in Bitburg

Tag der Promotion:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Meinen Eltern

In Gedenken an meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABSTRACT	3
KURZFASSUNG	4
1. EINLEITUNG	5
1.1 FGF-23	6
1.1.1 AUFBAU DES FGF-23	6
1.1.2 ROLLE DES FGF-23 IM KALZIUM-PHOSPHAT HAUSHALT	7
1.1.3 FGF-23 BEI CHRONISCHER NIERENERKRANKUNG	7
1.2 KLOTHO	9
1.2.1 STRUKTUR UND EXPRESSION VON KLOTHO	9
1.2.2 PHYSIOLOGISCHE WIRKUNG VON KLOTHO	9
1.2.3 KLOTHO BEI CHRONISCHER NIERENERKRANKUNG	11
1.3 HYPOTHESEN	13
2. MATERIAL, METHODEN UND PROBANDEN	14
2.1 STUDIENKOHORTE	14
2.1.1 PATIENTENKOLLEKTIV	14
2.1.2 EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN	14
2.2 ABLAUF EINER UNTERSUCHUNG	16
2.2.1 PROBENGEWINNUNG UND DIAGNOSTIK	16
2.3 BESTIMMUNG VON LÖSLICHEM KLOTHO MITTELS ELIS	17
2.4 BESTIMMUNG VON FGF-23 MITTELS ELISA	17
2.5 ERFASSUNG DER KÖRPERMAßE	18
2.5.1 KÖRPERGEWICHT, KÖRPERGRÖßE UND BODY-MASS-INDEX	18
2.5.2 HÜFTUMFANG, TAILLENUMFANG UND HÜFT-TAILLEN-QUOTIENT	18
2.6 ERFASSUNG DES RISIKOS EINER HERZ-KREISLAUF-ERKRANKUNG	19

2.6.1	BLUTDRUCKMESSUNG	19
2.6.2	FRAGEBOGEN	19
2.7	DEFINITION STUDIENENDPUNKTE	20
2.8	JÄHRLICHE NACHBEOBACHTUNG	20
2.9	STATISTISCHE AUSWERTUNG	21
3.	ERGEBNISSE	23
3.1	BASELINE CHARAKTERISTIKA	23
3.1.1	LÖSLICHE KLOTHO-PLASMASPIEGEL	26
3.1.2	FGF-23-PLASMASPIEGEL	27
3.2	JÄHRLICHE NACHBEOBACHTUNG	29
3.3	PRÄDIKTIVE EIGENSCHAFTEN VON KLOTHO UND FGF-23	33
3.4	COX REGRESSIONSANALYSE	38
4.	DISKUSSION	42
5.	LITERATURVERZEICHNIS	47
6.	ANHANG	63
6.1	EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG	63
6.2	DATENSCHUTZERKLÄRUNG	64
6.3	FRAGEBOGEN KARDIOVASKULÄRES RISIKO	65
6.4	FRAGEBOGEN FOLLOW-UP (TELEFONISCH)	72
7.	TABELLENVERZEICHNIS	76
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	77
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78
10.	PUBLIKATIONEN	80
11.	LEBENS LAUF	81
12.	DANKSAGUNG	83

Abstract

In recent years, the concept of chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD) became increasingly important. Firstly, it was recognized that a change in calcium-phosphate-homeostasis contributes to an increased cardiovascular morbidity in patients with chronic kidney disease. Secondly, with fibroblast growth factor 23 (FGF-23) and its co-receptor Klotho, new central regulators of calcium-phosphate-homeostasis were discovered, which have seemingly direct effects on blood vessels and the myocardium. α -Klotho exists in a membrane-bound and a soluble form ("soluble" Klotho - sKlotho). Results from experimental studies suggest vasculoprotective effects of sKlotho.

We measured traditional and novel CKD-MBD parameters among 444 CKD patients with GFR categories G2 – G4 in our ongoing CARE FOR HOME study. Across tertiles of baseline sKlotho and FGF-23, we analyzed the incidence of two distinct end points, namely the first occurrence of an atherosclerotic event, and the time until hospital admission for decompensated heart failure, or death.

sKlotho tertiles did neither predict atherosclerotic events ($p=0.139$), nor the occurrence of decompensated heart failure / death ($p=0.498$). In contrast, patients in the highest FGF-23 tertile had significantly higher risk for both end points in univariate analysis. Adjustment for kidney function attenuated the association between FGF-23 and atherosclerotic events / death (HR for third versus first FGF-23 tertile, 1.23 [95% CI, 0.58–2.61]; $p=0.59$), whereas the association between FGF-23 and decompensated heart failure / death remained significant after adjustment for potential confounders (HR for third versus first FGF-23 tertile, 4.51 [95% CI, 1.33–15.21]; $P=0.02$).

Our findings do not support the notion that sKlotho has vasculoprotective properties in CKD patients. In contrast, they confirm FGF-23, but not sKlotho, as an independent predictive biomarker for myocardial but not atherosclerotic events.

Kurzfassung

In den letzten Jahren gewann das Konzept der „chronic kidney disease – mineral and bone disorder“ (CKD-MBD) zunehmend an Bedeutung. Es wurde zum einen erkannt, dass eine Veränderung im Kalzium-Phosphat-Haushalt zu einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität bei nierenkranken Menschen beiträgt. Zum anderen entdeckte man mit FGF-23 und seinem Korezeptor Klotho neue zentrale Regulatoren des Kalzium-Phosphat-Haushaltes, die vermeintlich direkte Effekte auf die Gefäße und das Myokard haben. Von α -Klotho existiert sowohl eine membrangebundene als auch eine lösliche Form („soluble“ Klotho - sKlotho), wobei die Ergebnisse experimenteller Studien eine vaskuloprotektive Wirkung von sKlotho suggerieren. Wir untersuchten traditionelle und neuartige CKD-MBD Parameter bei 444 CKD-Patienten im KDIGO Stadium der chronischen Nierenerkrankung G2 - G4 in unserer laufenden CARE FOR HOME Studie. Anhand von sKlotho und FGF-23 Tertilen analysierten wir das Auftreten zweier kombinierter Endpunkte, nämlich das erste Auftreten atherosklerotischer Ereignisse, Hospitalisierung aufgrund akuter kardialer Dekompensationen oder Tod jedweder Genese. sKlotho Tertile konnten weder atherosklerotische Ereignisse / Tod (Log-Rank-Test: $p=0,139$), noch das Auftreten von akuter kardialer Dekompensation / Tod ($p=0,498$) prädictieren. Patienten in der höchsten FGF-23 Tertile wiesen ein signifikant höheres Risiko für beide kombinierte Endpunkte in univariaten Analysen auf. Die Korrektur für die Nierenfunktion im multivariaten Regressionsmodell schwächte die Assoziation zwischen FGF-23 und atherosklerotischen Ereignissen / Tod, (HR für drittes FGF-23 Tertile verglichen mit der ersten Tertile, 1,23 [95% KI 0,58 – 2,61]; $p=0,59$) während die Assoziation zwischen FGF-23 und akuter kardialer Dekompensation / Tod nach Anpassung für potentielle Störfaktoren signifikant bestehen blieb (HR für drittes FGF-23 Tertile verglichen mit der ersten Tertile 4,51 [95% KI 1,33 – 15,21]; $p = 0,02$). Unsere Ergebnisse widersprechen der postulierten Hypothese, dass sKlotho vaskuloprotektive Eigenschaften bei CKD-Patienten hat. Entgegen der bisherigen Vorstellung stellt FGF-23, im Gegensatz zu sKlotho, einen unabhängigen Prädiktor für myokardiale, aber nicht für atherosklerotische Ereignisse dar.

1. Einleitung

In der Bundesrepublik Deutschland steigt seit Jahren die Inzidenz und Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung (CKD). Laut einer Umfrage der Qualitätssicherung Niere¹ stieg von 1995 bis 2006 die Anzahl der Dialysepatienten von ca. 500 auf 800 Patienten pro Millionen Einwohner an. Neuere Daten aus dem europäischen Ausland und den USA zeigten ebenfalls eine drastische Zunahme der Inzidenz und Prävalenz der chronischen Nierenerkrankungen in den letzten Jahren^{2, 3}, sodass diese Erkrankungen auch zunehmend an sozioökonomischer Bedeutung erlangen.

Kardiovaskuläre Erkrankungen („cardiovascular diseases“ - CVD) stellen die Haupttodesursache bei Patienten mit CKD dar⁴, sodass man sich in der nephrologischen Forschung zunehmend der Entdeckung neuer Therapiestrategien zur Bekämpfung der immensen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität von CKD Patienten widmet. Die Behandlung sogenannter „klassischer“ kardiovaskulärer Risikofaktoren wie beispielsweise die Behandlung einer Dyslipidämie^{5, 6} oder der Einsatz von ACE-Hemmern⁷ führten zu keiner nennenswerten Prognosebesserung. Auch die Fokussierung auf „CKD-spezifische“ Faktoren wie eine frühe Dialyseeinleitung bzw. Steigerung der Dialysedosis^{8, 9} oder der Beginn einer Erythropoetin-Substitution zur Therapie der renalen Anämie^{10, 11} konnte keine Verbesserung des ereignisfreien Überlebens erzielen.

Störungen des Mineral- und Knochenstoffwechsels sind häufige Komplikationen der chronischen Nierenerkrankung (CKD-MBD, chronic kidney disease – mineral and bone disorder). Der Begriff der CKD-MBD beinhaltet drei Komponenten:

1. Abnorme Laborparameter der Kalzium-Phosphat Homöostase, typischerweise eine Hypokalzämie, Hyperphosphatämie, ein Hyperparathyroidismus sowie eine Hypovitaminose D; 2. Knochenanomalien mit einem erhöhten Frakturrisiko und 3. Eine frühzeitige Verkalkung der Gefäße oder anderer Weichgewebe¹². In mehreren Observationsstudien stellte jeder veränderte CKD-MBD Laborparameter für sich einen eigenständigen Risikofaktor dar¹³⁻¹⁵, jedoch konnte bis dato der eindeutige Beweis einer günstigen Beeinflussung dieser Parameter mit einer konsekutiven Verbesserung des kardiovaskulären Überlebens in prospektiven, randomisierten Interventionsstudien noch nicht erbracht werden. Dennoch zeigten sich Therapiestudien, die beispielsweise die Beeinflussung von Surrogatmarkern wie Gefäß- und Herzklappenverkalkungen

durch die Einnahme des Kalziummimetikums Cinacalcet untersuchten¹⁶ sowie der Vergleich des Ein-Jahres-Überlebens von Patienten mit und ohne Phosphatbindereinnahme an der Hämodialyse¹⁷, vielversprechend.

In den letzten Jahren veränderte die Entdeckung des Fibroblast Growth Factors (FGF)-23 und seines Korezeptors Klotho, als zentrale Regulatoren der Kalzium-Phosphat-Homöostase, grundlegend das bisherige Verständnis der CKD-MBD¹⁸.

1.1 FGF-23

1.1.1 Aufbau des FGF-23

Zur Familie der FGFs (Fibroblast Growth Factor) gehören eine Reihe von Polypeptiden, die einen gemeinsamen Kernbereich aufweisen. Alle diese Proteine haben in der Kernregion eine charakteristische Beta-Kleeblattstruktur, die aus Beta-Faltblättern und Schleifen aufgebaut ist. Basierend auf phylogenetischen Analysen wurden menschliche FGFs bisher in 7 Subfamilien eingeteilt (FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-7, FGF-9, FGF-10 und FGF-19)¹⁹.

FGF-23 besteht aus 251 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 26 000 Da und wird hauptsächlich durch Osteozyten sezerniert^{19, 20}. Die Mitglieder der FGF-19 Familie, zu der auch FGF-23 gehört, regulieren verschiedene systemische Prozesse wie die Stoffwechselrate²¹ und die Gallensäurehomöostase²² (FGF-19), den Glucose- und Lipidstoffwechsel²³ (FGF-21) sowie die Phosphat- und Vitamin-D-Homöostase²⁴ (FGF-23). Diese Aktivitäten erreichen sie durch ihre endokrine Wirkung, im Gegensatz zu der typischen parakrinen Wirkung der anderen FGF Subfamilien. Die parakrin wirksamen FGFs weisen eine Kernregion auf, welche aus 12 antiparallelen Beta-Faltblättern besteht. Bei der FGF-19 Familie fehlt die Region zwischen Beta-10 und Beta-12, sodass diese nur aus 11 Beta Faltblättern besteht und dadurch weniger stark an Heparin bindet. Folglich sind die Mitglieder der FGF-19 Unterfamilie weniger lokal in der extrazellulären Matrix aktiv und können somit endokrine, systemische Funktionen ausüben^{19, 25}.

1.1.2 Rolle des FGF-23 im Kalzium-Phosphat Haushalt

FGF-23 vermittelt seine physiologische Wirkung an Zellen der Niere und Nebenschilddrüsen, indem es in Anwesenheit seines membrangebunden Korezeptors Klotho an die FGF-Rezeptoren bindet. Die selektive zelluläre Expression von Klotho in genau diesen Organen ermöglicht, trotz der ubiquitären Expression von FGF-Rezeptoren, eine spezifische Wirkung von FGF-23. In der Niere steigert FGF-23 die Phosphatausscheidung, indem es die Expression und Aktivität des Natrium / Phosphat Kotransporters im proximalen Tubulus hemmt²⁶. Zusätzlich reduziert FGF-23 die gastrointestinale Aktivität des Natrium / Phosphat Kotransporters und hemmt so die Phosphataufnahme²⁷. Weiterhin senkt FGF-23 die Serumspiegel von Calcitriol durch Hemmung der 1-Alpha-Hydroxylase (CYP27B1), des Schlüsselenzyms der Calcitriolsynthese, und steigert zudem die Expression des calcitriolabbauenden Enzyms, der 24-Hydroxylase (CYP24A1)²⁸. Da Calcitriol einen Regulator der gastrointestinalen Phosphatabsorption darstellt, besteht zusätzlich eine indirekte Senkung des Serumphosphats. Da Calcitriol die Synthese und Freisetzung von FGF-23 aus den Knochen stimuliert, indem es an den FGF-23 Genpromoter bindet, besteht ein negativer Feedbackkreis zwischen FGF-23 und Calcitriol²⁹. Ein weiterer Regelkreis könnte zwischen Parathormon und FGF-23 bestehen. FGF-23 unterdrückt die PTH Synthese *in vitro*³⁰ und *in vivo*³¹. Im Gegensatz dazu ist derzeit noch ungewiss, ob PTH einen Effekt auf FGF-23 ausübt, da diesbezüglich noch widersprüchliche Daten vorliegen^{29, 32-37}.

1.1.3 FGF-23 bei chronischer Nierenerkrankung

Im Gegensatz zur nierengesunden Normalbevölkerung haben dialysepflichtige chronisch nierenkranke Menschen bis zu 100-fach höhere FGF-23-Serumspiegel³⁸. Neuere Arbeiten erweiterten diese Ergebnisse und zeigten bereits einen Anstieg der FGF-23-Serumspiegel in sehr frühen Stadien der CKD³⁹. Bei Messungen an Teilnehmern der CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort Study) zeigte sich, dass bei mehr als der Hälfte aller Probanden mit leicht eingeschränkter glomerulärer Filtrationsrate (GFR) (definiert als eine geschätzte glomeruläre Filtrationsrate von 50 – 59 ml/min) die FGF-23 Spiegel schon erhöht waren, während Parathormon nur bei 22% der Probanden erhöht war. Daher wird der

Anstieg von FGF-23 als die früheste nachweisbare Veränderung der CKD-MBD betrachtet.

40

Zudem zeigte die CRIC-Studie, dass erhöhte FGF-23 Serumspiegel zum einen einen unabhängigen Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität bei CKD Patienten im Stadium 2-4 und zum anderen ein erhöhtes Risiko für das Eintreten einer Dialysepflichtigkeit darstellen. Im Gegensatz zur MMKD (Mild to Moderate Kidney Disease) Studie⁴¹, die FGF-23 als renalen Prädiktor in allen GFR-Stadien identifizierte, traf dies für die CRIC-Teilnehmer nur bei einer Ausgangs-GFR von > 30 ml/min zu. Die Assoziation von erhöhten FGF-23 Spiegel mit einer erhöhten Gesamtmortalität konnte sowohl für inzidente als auch für prävalente Hämodialysepatienten bestätigt werden.⁴² Ein erster Zusammenhang zwischen FGF-23 und kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität bei chronischer Nierenerkrankung konnte durch die HOST Studie aufgezeigt werden: Der Zusammenhang zwischen hohen Plasma FGF-23 Konzentrationen und kardiovaskulären Ereignissen sowie Mortalität zeigte sich unabhängig von klassischen Risikofaktoren wie Alter, Bluthochdruck und Nikotinkonsum. Besonders deutlich war die Assoziation zwischen FGF-23, der Gesamtmortalität, akutem Myokardinfarkt und Amputationen der unteren Extremität.⁴³

Die zugrundliegende Kausalität der Assoziation zwischen erhöhten FGF-23-Plasmaspiegeln und ungünstiger Prognose ist nach wie vor ungeklärt. Vor dem Hintergrund der Erkenntnisse durch die HOST Studie wird eine Rolle von FGF-23 in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, welche maßgeblich zur dramatisch hohen Sterblichkeit bei CKD-Patienten beitragen, postuliert. Ferner wird diese Vermutung durch weitere rezente Ergebnisse epidemiologischer Untersuchungen bestärkt, welche einen unabhängigen Zusammenhang zwischen FGF-23 und echokardiografisch gemessener links-ventrikulärer Hypertrophie (LVH) bei Patienten sowohl mit CKD^{44, 45} als auch bei Menschen mit intakter Nierenfunktion⁴⁶ identifizierten, sodass eine kausale Rolle von FGF-23 in der Induktion kardiovaskulärer Erkrankungen möglich erscheint.

1.2 Klotho

1.2.1 Struktur und Expression von Klotho

Zur Klotho-Familie gehören 3 verschiedene transmembranöse Proteine, die Alpha-Klotho, Beta-Klotho und Gamma-Klotho genannt werden. Sie unterscheiden sich durch ihre extrazelluläre Domäne und den Ort ihrer Expression⁴⁷. Alpha-Klotho ist überwiegend im distalen Tubulus der Niere, der Nebenschilddrüse³¹ und dem Plexus Choroideus im Gehirn⁴⁸ exprimiert. Das humane Klotho-Gen hat eine Größe von ungefähr 50 kb (Kilo-Basenpaare), besteht aus 5 Exons und liegt auf dem Chromosom 13q12. Es gibt zwei unterschiedliche Transkriptvarianten, die durch alternatives Splicen entstehen: ein Transkript mit 3036 bp (Basenpaaren), welches für ein Transmembranprotein mit 1012 Aminosäuren (AS) kodiert. Dieses enthält einen großen extrazellulären Anteil, der aus zwei internen repeats besteht (hKL1 und hKL2), einen einzelnen transmembranösen Anteil und eine kurze intrazelluläre Domäne. Die transmembranöse Form von Klotho gehört zur Familie der Beta-Glucosidasen, welche in der Lage sind beta-glykosidische Verbindungen in Sacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden zu hydrolisieren.^{48, 49} Die andere Transkriptvariante ist bis auf eine 50 bp lange Insertion identisch mit der membrangebundenen Form. Diese Insertion enthält allerdings ein Stopp-Codon, welches die Translation abbricht. Dadurch fehlt dem zweiten 549 AS langem Protein, gegenüber der transmembranösen Variante, ein internes repeat (hKL2), der transmembranöse Anteil und die intrazelluläre Domäne.⁵⁰ Diese Transkriptvariante stellt die lösliche Form des Klotho dar. Eine zusätzliche Variante der löslichen Klothoform entsteht durch die Abspaltung der extrazellulären Domäne des transmembranösen Klothos mit Hilfe von Proteasen⁵⁰. Somit existieren nach aktuellem Wissensstand drei Formen von Alpha-Klotho.

1.2.2 Physiologische Wirkung von Klotho

Die endokrin aktiven FGFs sind durch das Fehlen der Heparin-bindenden Domäne in der Kernregion charakterisiert, wodurch sie nicht lokal gebunden sind und somit

systemische Wirkungen ausüben können. Hypothetisch könnte FGF-23 den FGF-Rezeptor (FGFR) nicht aktivieren, da zu dieser Aktivierung ein Dreifach-Komplex aus FGF, Heparan Sulfat (HS) und FGFR benötigt wird. Endokrine FGFs benötigen daher einen alternativen Kofaktor anstelle des HS, das transmembranöse Klotho Protein. Identifiziert wurde Klotho als Korezeptor für FGF-23, da FGF-23-defiziente und Klotho-defiziente Mäuse fast den gleichen Phänotyp zeigten: verkürzte Lebensdauer, Wachstumsverzögerung, Gefäßverkalkung in den Nieren, Infertilität, Muskelatrophie, erhöhte Serum-Phosphat-Spiegel und Hypoglykämie.⁵¹ Das Klotho Protein bildet Komplexe mit FGFR1c, FGFR3 und FGFR4, um die Affinität dieser Rezeptoren für FGF-23 zu erhöhen.⁵¹ Da die FGFR ubiquitär vorhanden sind, ist die Anwesenheit von Klotho entscheidend, ob eine Zelle ein physiologisches FGF-23-Ziel darstellt oder nicht.⁴⁷

Bis dato ist ungeklärt, warum FGF-23 Funktionen im proximalen Tubulus übernehmen kann, obwohl sein Korezeptor Klotho hauptsächlich im distalen Tubulus exprimiert wird. Dabei werden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen, welche sich nicht gegenseitig ausschließen. (1) Eine Möglichkeit ist, dass FGF-23 direkt, unabhängig von Klotho, den Natrium – Phosphat Kotransporter (Npt2a) im proximalen Tubulus hemmt. Allerdings widersprechen einige Daten dieser Hypothese: FGF-23 Injektionen bei Wildtyp Mäusen aktivierten ein Signal nur im distalen, aber nicht im proximalen Tubulus⁵². (2) Die andere Möglichkeit besteht darin, dass FGF-23 im distalen Tubulus die Ausschüttung eines parakrinen Faktors bewirkt, der dann im proximalen Tubulus den Npt2a hemmt. Dieser parakrine Faktor könnte sKlotho sein.^{53, 54} Eine weitere Funktion von sKlotho ist der Ausgleich einer FGF-23 induzierten Hypokalzämie durch Inhibition der Calcitriolsynthese. sKlotho gehört zur Familie der Glucosidasen und verhindert durch Entfernung von Sialinsäureestern auf den transmembranösen Kalziumkanälen TRPV5 und TRPV6 (transient receptor potential cation channel subfamily V, member 5 und 6) dessen Internalisierung von der Plasmamembran^{55, 56}. TRPV5 bewirkt eine Kalziumrückresorption im proximalen Tubulus, TRPV6 eine intestinale Kalziumabsorption⁵⁷. Ebenfalls durch Entfernung von Sialinsäureestern verhindert lösliches Klotho eine Internalisierung von ROMK1 (renal outer medullary potassium Channel 1). ROMK1 ist im distalen Nephron exprimiert und vermittelt die Kaliumausscheidung in den Urin⁵⁸. Somit scheint sKlotho eine zentrale Rolle in der Regulation der Kalzium- und Kalium- Homöostase zu übernehmen.

1.2.3 Klotho bei chronischer Nierenerkrankung

Klotho wird am stärksten in der Niere exprimiert, und interessanterweise ähnelt der Phänotyp der chronischen Nierenerkrankung dem der Klotho Knock-out Maus mit Gefäßverkalkung, Hyperphosphatämie, hohem Serum-FGF-23, Störungen des Knochenstoffwechsels und verkürztem Überleben, was darauf hindeutet, dass die chronische Nierenerkrankung eine Ursache des Klotho-Mangels darstellen könnte.⁵⁹ Aufgrund der gewebeständigen Eigenschaften von Klotho waren bisher invasive Methoden erforderlich, um die Klotho Expression zu messen. Deshalb gibt es nur wenige Studien an CKD-Patienten. Eine Biopsiestudie zeigte eine Verminderung des membranständigen Klothos in Verbindung mit einer abnehmenden Nierenfunktion bei Patienten mit diabetischer Nephropathie.⁶⁰ In einer anderen Studie, in der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz einer Nephrektomie unterzogen wurden, zeigte sich renal eine verminderte Expression des Klotho Proteins und der dazugehörigen mRNA.⁶¹ Die Bestimmung des löslichen Klotho und die Beziehung zu membranständigem Klotho ist von besonderem Interesse. Neuerdings kann man lösliches Klotho mittels kommerziell verfügbarem ELISA messen, wobei die Ergebnisse noch recht uneinheitlich sind.⁶² Einige kleine Kohortenstudien bestimmten nun mittels dieser neuen ELISA-Technik lösliches Klotho in Korrelation mit der Nierenfunktion. Dabei zeigte sich eine Abnahme des löslichen Klothos bei gleichzeitig progredienter CKD und somit abnehmender Nierenfunktion⁶³⁻⁶⁵. In der CARE FOR HOME Studie unserer Arbeitsgruppe wurde hingegen gezeigt, dass das lösliche Klotho nicht mit dem Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung assoziiert ist, und auch keinen unabhängigen Prädiktor des renalen- und Gesamtüberlebens darstellt.⁶⁶ Einen anderen Ansatz verfolgte eine tierexperimentelle Studie, bei der lösliches Klotho bei Mensch und im Tiermodell mittels Immunopräzipitation und Immunoblot bestimmt wurde. Dort zeigte sich, dass es bereits in einem frühen Stadium der CKD (K/DOQI 1-2) zu einer deutlichen Herabregulation von löslichem Klotho im Blut und Urin kommt.⁶⁷ In der Summe lässt sich sagen, dass es widersprüchliche Daten bezüglich des Zusammenhanges zwischen löslichem Klotho und der Nierenfunktion gibt. Vor diesem Hintergrund wurden die Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen kontrovers diskutiert, die einerseits nephroprotektive⁶⁸ sowie auch vaskuloprotektive Eigenschaften⁶⁷ durch eine verstärkte Klotho-Expression bzw. durch Verabreichung des Klotho-Proteins suggerierten.

Beispielsweise postulierten Lim et al., dass die CKD ein Status des lokalen, vaskulären Klotho-Mangels sei. Sie fanden heraus, dass glatte Gefäßmuskelzellen sich durch Klotho-Mangel zu Osteo- / Chondrozyten-ähnlichen Zellen umdifferenzieren, d.h. dass sich der Phänotyp von einem kontraktilem Apparat zu einem kalzifizierten, knochenähnlichen Phänotyp verändert.⁶⁹

Ergänzend zeigten experimentelle Untersuchungen am atherosklerotischen Nagetiermodell, in dem Tiere mehrere atherogene Risikofaktoren aufwiesen, dass sich durch eine Adenovirus-vermittelte Klothogen-Übertragung eine vorhandene vaskuläre endotheliale Dysfunktion mildert, die vaskuläre NO-Produktion erhöht und der atherosklerotische Phänotyp insgesamt durch Verringerung des Blutdrucks und durch vaskuläres Remodelling verbessert wird⁷⁰. Zudem könnte Klotho vor einem Gefäßschaden schützen, indem es die Stickstoffmonoxid-Freisetzung reguliert^{70, 71}. Eine weitere Studie durch Hu et al. zeigte eine Assoziation eines Klotho-Mangels bei CKD mit der Gefäßverkalkung und im Gegenzug eine Reduktion dieser Gefäßveränderungen durch die Überexpression von Klotho. Zum anderen fand man heraus, dass lösliches Klotho die Kalzifizierung der Gefäße durch die Inhibition der Natrium-abhängigen Phosphataufnahme hemmen kann.⁶⁷

1.3 Hypothesen

Aufgrund der im Tiermodell suggerierten vaskuloprotektiven Eigenschaften von sKlotho soll nun die prädiktive Bedeutung der sKlotho-Plasmaspiegel bei chronisch nierenkranken Menschen in unserer prospektiven CARE FOR HOME Studie untersucht werden. Weiterhin erfolgt die zusätzliche Bestimmung der FGF-23-Plasmaspiegel als etablierter kardiovaskulärer Risikomarker.

Folgende Hypothesen werden im Rahmen dieser Promotionsarbeit überprüft:

1. sKlotho-Plasmaspiegel sind unabhängige Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse bei CKD-Patienten im CKD Stadium 2-4.
2. sKlotho-Plasmaspiegel übertreffen in ihrer prädiktiven Wertigkeit FGF-23 als kardiovaskulären Risikomarker bei CKD-Patienten im CKD-Stadium 2-4.

2. Material, Methoden und Probanden

2.1 Studienkohorte

2.1.1 Patientenkollektiv

In unserer laufenden CARE FOR HOME Studie wurden bisher 444 Probanden aus unserer nephrologischen Ambulanz rekrutiert. Der Einschluss erfolgte zwischen September 2008 und November 2012. Alle Probanden wurden entweder während eines Besuches der Ambulanz oder telefonisch zur Teilnahme an unserer Studie eingeladen. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Teilnehmern unterschrieben (siehe Anhang). Des Weiteren wurde die Studie durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

Eingeschlossen wurden die Patienten, die an einer chronischen Nierenerkrankung in den CKD-Stadien 2-4 leiden. Dies wurde definiert, als eine eGFR zwischen 15 und 89 ml/min /1,73m² nach MDRD 4 (Modification of Diet in Renal Disease Studie)⁷² basierend auf den K/DOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) Leitlinien⁷³ der National Kidney Foundation. Bei Patienten im Stadium 2 musste mindestens eines der folgenden Kriterien zusätzlich vorliegen:

- erhöhtes Plasma-Kreatinin (> 1,2 mg/dl bei Männern und > 1,0 mg/dl bei Frauen)
- erhöhtes Cystatin C (> 1,05 mg/dl)
- persistierende glomeruläre Hämaturie
- persistierende Albuminurie (> 17 mg/g Kreatinin bei Männern und > 25 mg/g Kreatinin bei Frauen)
- bioptisch gesicherte Nierenerkrankung
- hereditäre Nierenerkrankung

Definition der chronischen Nierenerkrankung:

1. Nierenschädigung für ≥ 3 Monate, definiert durch strukturelle oder funktionelle Veränderungen der Niere mit oder ohne Reduktion der GFR, manifestiert durch:
 - pathologische Veränderungen, oder
 - Marker der Nierenschädigung (Abweichungen der Blut oder Urinwerte, durch Bildgebung belegte Veränderungen).
2. $GFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ für ≥ 3 Monate, mit oder ohne weitere Zeichen der Nierenschädigung.⁷⁴

Tabelle 1: Stadieneinteilung chronische Nierenerkrankung

Stadium	Beschreibung	GFR (ml/min/1,73m ²)
1	Nierenfunktionseinschränkung mit normaler GFR	≥ 90
2	Nierenfunktionseinschränkung mit leicht reduzierter GFR	60 – 89
3	Nierenfunktionseinschränkung mit deutlich reduzierter GFR	30 – 59
4	Nierenfunktionseinschränkung mit deutlich reduzierter GFR	15 – 29
5	Nierenfunktionseinschränkung mit deutlich reduzierter GFR	< 15

Ausschlusskriterien:

Folgende Ausschlusskriterien wurden definiert:

- akutes Nierenversagen (Serum Kreatininanstieg $> 50 \%$ innerhalb von 4 Wochen)
- chronische Nierenerkrankung im Stadium 1 oder 5 nach K/DOQI
- akute Infektionen bei Studienbeginn (CRP $> 50 \text{ mg/l}$ und / oder benötigte systemische antibiotische Therapie)
- immunsuppressive Therapie
- stattgefundene Nierentransplantation
- maligne Erkrankungen
- bestehende HIV-Infektion
- hämatologische Systemerkrankungen
- Schwangere
- Patienten < 18 Jahre

2.2 Ablauf einer Untersuchung

2.2.1 Probengewinnung und Diagnostik

Zu Beginn jeder Untersuchung wurde den Studienteilnehmern Blut abgenommen. Dazu mussten diese nüchtern, d.h. mindestens 8 Stunden ohne Nahrungsaufnahme, erscheinen. Die Blutentnahme erfolgte am sitzenden Patienten nach fünfminütiger Ruhezeit. Mittels steriler Kanüle wurde eine oberflächige Vene zur Entnahme von venösem Vollblut punktiert. Die entsprechenden Laboruntersuchungen wurden durch das Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes durchgeführt.

Tabelle 2: Parameter Blutwerte

Blutprobe	Bestimmte Parameter
Plasma (4,7ml Lithium-Heparin-Monovette)	Kalium, Kalzium, Natrium, Kreatinin, Phosphat, Harnstoff, CRP, Glukose, Eiweiß, Albumin, Eisen, Ferritin, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, Troponin-T, ASAT
EDTA-Blut (2,7ml EDTA-Monovette)	Differentialblutbild: Leukozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Lymphozyten, Monozyten)
Serum (4,7ml Serum-Monovette)	25-Hydroxy-Vitamin D3, Insulin, Parathormon, Apo A, Apo B, NT-pro-BNP,

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, ASAT: Aspartat-Aminotransferase, HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, CRP: C-reaktives Protein, Apo A: Apolipoprotein A, Apo B: Apolipoprotein B, NT-pro-BNP: N-terminal prohormone of Brain Natriuretic Peptide

Ebenfalls wurde zu Beginn jeder Untersuchung Spontanurin asserviert. Dabei wurden die Patienten gebeten den Mittelstrahlurin abzugeben. Dieser wurde ebenfalls durch das Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes hinsichtlich folgender Parameter untersucht:

Tabelle 3: Spontan- und Sammelurin-Untersuchungsparameter

Probe	Bestimmte Parameter
Urin (10 ml Urin-Monovette)	Status, Sediment, Phosphat, Kreatinin, Albumin, Eiweiß, Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid, Transferrin, Mikroglobulin, Immunglobulin G

2.3 Bestimmung von löslichem Klotho mittels ELISA

Die Bestimmung von sKlotho im Plasma erfolgte mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren Sandwich ELISAs (Immuno-Biological Laboratories, Fujioka-shi, Gunma, Japan⁶²). Für diesen ELISA werden 2 spezifische Antikörper benötigt, welche an das Antigen (sKlotho) binden. Der anti-humane Klotho Maus IgG Antikörper 67G3 fungiert dabei als „Fängerantikörper“ und ist zu diesem Zweck auf einer Mikrotiterplatte befestigt. Zunächst wird bei Raumtemperatur für 60 Minuten die Patientenprobe auf die Platte gegeben, sodass die Antikörper an das Antigen binden können. Danach wird der Versuchsansatz gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundenen Antigene zu entfernen. Anschließend wird der zweite, mit HRP (Horseradish Peroxidase)-konjugierte Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben. Dieser anti-humane Klotho Maus IgG Fab-Antikörper 91F1 dient als Nachweisantikörper und ist auch zu diesem Zweck mit einem Enzym gekoppelt. Nach erneutem Waschen der Platte wird Tetramethylbenzidin und anschließend eine Stopp-Lösung zugegeben. Der durch die Reaktion des Enzyms mit dem Tetramethylbenzidin entstehende Farbumschlag, dessen Intensität die Klothokonzentration darstellt, wird im Spektrophotometer bei 450nm gemessen.

2.4 Bestimmung von FGF-23 mittels ELISA

Die Bestimmung von FGF-23 im Serum erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren ELISAs (Immutopics, San Clemente, CA, USA; untere Nachweisgrenze 1,5 rU/ml, obere Nachweisgrenze 1500 rU/ml), mit analoger Vorgehensweise wie oben für die Messung von sKlotho beschrieben. Proben mit einer FGF-23 Konzentration > 1500 rU/ml werden nach Verdünnung gemessen. Da sich die C-terminale Form des FGF-23,

gegenüber dem intakten FGF-23, bei Messungen vor allem bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung als stabiler herausgestellt hat, wurde die C-terminale Form von FGF-23 bestimmt.^{75, 76}

2.5 Erfassung der Körpermaße

2.5.1 Körpergewicht, Körpergröße und Body-Mass-Index

Bei jeder Vorstellung wurden die Patienten auf einer geeichten digitalen Waage auf 100g genau gewogen. Die Körpergröße wurde barfuß bestimmt, dabei stand der Patient aufrecht gegen die Wand gelehnt. Der Wert wurde dabei an einer Messlatte abgelesen. Diese beiden Werte ergeben dann anhand folgender Formel den Body-Mass-Index (BMI):

$$\text{BMI (kg/m}^2\text{)} = \text{Körpergewicht (kg)} / \text{Körpergröße (m)}^2$$

2.5.2 Hüftumfang, Taillenumfang und Hüft-Taillen-Quotient

Mit einem flexiblen Maßband wurde auf der Höhe des Trochanter Major der Hüftumfang, sowie in der Mitte zwischen Crista iliaca und Rippenbogen der Taillenumfang gemessen. Anhand dieser beiden Werte ließ sich der Hüft-Taillen-Quotient (waist-hip-ratio) zur Abschätzung der Körperfettverteilung mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Hüft-Taillen-Quotient} = \text{Hüftumfang (cm)} / \text{Taillenumfang (cm)}$$

2.6 Erfassung des Risikos einer Herz-Kreislauf-Erkrankung

2.6.1 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte mit Hilfe eines automatischen Blutdruckmessgerätes (DINAMAP® PROCARE Auscultatory 100, SOMA Technology, USA). Diese nichtinvasive Blutdruckmessung (NIBP) wurde standardisiert am sitzenden Patienten nach fünfminütiger Ruhepause sowohl am linken als auch am rechten Oberarm durchgeführt.

2.6.2 Fragebogen

Zusätzlich wurden bei den Patienten bestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren und kardiovaskuläre Komorbiditäten anhand eines standardisierten Fragebogens (siehe Anhang) durch den Untersucher erfragt. Zunächst erfolgte die Erfassung einer prävalenten koronaren, zerebrovaskulären oder peripher-arteriellen Gefäßerkrankung⁷⁷.

Die sportliche Aktivität der Probanden wurde über die Anzahl der Wochentage ermittelt, an denen sie sich mindestens 30 Minuten sportlich betätigten, sodass sie ins Schwitzen kommen. Im Gegenzug wurde auch die körperliche Inaktivität erfasst. Diese wurde über die Anzahl der vor dem Fernseher verbrachten Stunden pro Tag, aufgeteilt in Wochentage und Wochenendtage, erfragt. Erfragt wurde auch der Nikotinkonsum, wobei als Raucher derjenige galt, der in den letzten vier Wochen vor Studieneinschluss mindestens eine Zigarette geraucht hat. Ebenso wurde der Zeitraum dokumentiert, in dem der Proband aktiver Raucher war, sowie der Zeitpunkt der letzten Zigarette und die durchschnittliche Anzahl täglich gerauchter Zigaretten.

Auch der Alkoholenuss wurde dokumentiert. So wurde dieser für unterschiedliche Getränkesorten in Gläsern pro Woche angegeben. Wobei ein Glas 120 ml Rot- oder Weißwein, 350 ml Bier und 45 ml Spirituosen entsprach.

Es wurde erfragt, ob der Patient an einer chronisch-entzündlichen Darm- oder Lebererkrankung leidet, eine Tumorerkrankung besteht oder eine akute Infektion in den letzten 5 Tagen aufgetreten ist. Zuletzt wurde noch die Aktualität des Medikamentenplans eruiert.

2.7 Definition Studienendpunkte

Es wurden zwei kardiovaskuläre Endpunkte vordefiniert:

1. Atherosklerotische Ereignisse
(akuter Herzinfarkt; interventionelle oder chirurgische Revaskularisierung der Koronararterien, Zerebralarterien oder peripherer Arterien; Schlaganfall, definiert als schnell fortschreitende klinische Symptome und / oder Zeichen einer nachhaltigen fokalen oder globalen Störung der Hirnfunktion \geq 24 Stunden; Amputationen proximal des Sprunggelenks);
und / oder Tod jedweder Genese
2. Stationäre Behandlung aufgrund akuter kardialer Dekompensation;
und / oder Tod jedweder Genese

2.8 Jährliche Nachbeobachtung

Jeder Patient wurde jährlich zu einem Termin in unserer nephrologischen Ambulanz eingeladen. Wenn dies nicht möglich war wurde der Patient und / oder sein Hausarzt telefonisch kontaktiert und die entsprechenden Informationen ebenfalls anhand eines standardisierten Fragebogens (siehe Anhang) erhoben.

Folgenden Untersuchungen wurden bei der jährlichen Kontrolle durchgeführt:

- standardisierte Entnahme venösen Vollblutes
- Asservation von Spontanurin
- Asservation von 24h Sammelurin
- standardisierte Erfassung des aktuellen Körpergewichtes
- Erhebung eines standardisierten Fragebogens durch den Verfasser dieser Promotionsarbeit (s. Anhang)
- nicht-invasive Blutdruckmessung und standardisierte Intervallblutdruckmessung
- standardisierte Erfassung des Hüft-, Taillenumfangs
- standardisierte Bestimmung der Hautfaltendicke der Patienten
- standardisierte Echokardiographie

- Aufzeichnung eines Elektrokardiogramm
- Aufzeichnung eines 24h Blutdruckprofils

Der Verfasser der vorgelegten Dissertationsschrift führte alle Folgeuntersuchungen der Studienteilnehmer zwischen dem 01.03.2013 und dem 30.09.2013 selbständig durch. Nach Bestimmung der sKlotho-Plasmaspiegel im Jahr 2013 aus tiefgefrorenen Plasmaproben erfolgte die statistische Auswertung aller in der Dissertationsschrift aufgeführten Studienergebnisse zur Bedeutung von sKlotho bei chronischer Nierenerkrankung. Die Patientenrekrutierung erfolgte im Rahmen weiterer eigenständiger Promotionsarbeiten.

2.9 Statistische Auswertung

Alle Messdaten wurden mittels Microsoft® Excel oder Access verwaltet (Microsoft®, Seattle, Washington, USA).

Für die statistische Auswertung der Daten wurde die Statistik Software SPSS (Statistical Product and Service Solutions; Version 17.0 Chicago, Illinois, USA) und SimpleStat Test (©2007-2011 by Marley W. Watkins) verwendet ⁷⁸.

Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung, bei Abweichung von der Normalverteilung als Median [Interquartil-Abstand] angegeben und mittels T-Test (zwei Gruppen) oder mittels ANOVA (analysis of variance) mit gewichtetem linearen Term (mehr als zwei Gruppen) verglichen.

Kategoriale Variablen wurden als absolute Werte und als prozentualer Anteil an dem Gesamtkollektiv angegeben und mittels Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) verglichen.

Zusammenhänge zwischen zwei kontinuierlichen Variablen wurden als Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet.

Mit der Überlebenszeitanalyse und Kaplan-Meier-Methode wurde das Auftreten von Ereignissen in den unterschiedlichen Tertilen von FGF-23 und Klotho beurteilt. Die Gruppen der Überlebenszeitanalyse wurden anschließend mittels log-rank Testung auf Ereignisfreies Überleben verglichen.

In einem multivariaten Regressionsmodell mittels Cox-Regressionsanalyse wurde die Assoziation von FGF-23 und Klotho zu den Endpunkten atherosklerotische Ereignisse / Tod und akute kardiale Dekompensation / Tod nach Korrektur für potentielle Störvariablen untersucht.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % wurde $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Baseline Charakteristika

Die Baseline Charakteristika der Studienteilnehmer sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Probanden wurden anhand der KDIGO-Stadien⁷⁹ eingeteilt, bei der sich eine Häufung der Patienten im Stadium 3 zeigte. Diese Patienten wurden dann nochmals anhand der aktualisierten Einteilung der Stadien der CKD nach KDIGO in die Stadien 3a (45 – 60 ml/min) und 3b (30 – 45 ml/min) eingeteilt. Wie zu erwarten waren die Patienten in den fortgeschrittenen KDIGO-Stadien signifikant älter, hatten höhere CRP-, FGF-23- und Phosphatspiegel im Plasma. Außerdem stieg die Albumin- und fraktionierte Phosphatausscheidung im Urin mit zunehmendem Krankheitsstadium erwartungsgemäß an. Es zeigte sich zudem, dass die Patienten in höheren Stadien häufiger aktive und native Vitamin D₃ Präparate, Betablocker und Statine einnahmen als Patienten in früheren Stadien der CKD. Schließlich zeigte sich noch eine leichte, aber dennoch signifikante, Abnahme der löslichen Klothospiegel im Plasma mit zunehmender Nierenfunktionseinschränkung.

Tabelle 4: Baseline Charakteristika - stratifiziert nach KDIGO-Stadien 2-4

	Gesamt (n=444)	G2 (n=89)	G3a (n=128)	G3b (n=145)	G4 (n=82)	p
Alter (Jahre)	65 ± 12	58 ± 12	65 ± 13	68 ± 11	68 ± 12	<0,001
Geschlecht weiblich (%)	179 (40)	28 (31)	64 (50)	52 (36)	35 (43)	0,36
Raucher (%)	44 (10)	14 (16)	13 (10)	11 (8)	6 (7)	0,18
Diabetes mellitus (%)	168 (38)	28 (31)	57 (45)	47 (32)	36 (44)	0,64
KVE (%)	135 (30)	11 (12)	45 (35)	51 (35)	28 (34)	<0,001
verminderte LV Funktion (%)	62 (15)	9 (11)	12 (9)	28 (23)	13 (16)	0,006
CRP (mg/l)	2,7 (1,2-5,3)	2,4 (1,5-4,8)	2,6 (1,0-5,2)	2,9 (1,2-6,0)	3,5 (1,1-5,6)	0,003
Gesamtcholesterin (mg/dl)	193 ± 42	199 ± 37	191 ± 40	191 ± 45	193 ± 47	0,47
HDL-C (mg/dl)	52 ± 17	52 ± 16	53 ± 18	51 ± 17	49 ± 17	0,18
LDL-C (mg/dl)	116 ± 36	122 ± 32	113 ± 35	114 ± 36	117 ± 39	0,41
BMI (kg/m ²)	30 ± 6	30 ± 6	31 ± 6	30 ± 6	29 ± 5	0,20
Kalzium (mmol/l)	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2	0,19
Phosphat (mg/dl)	3,4 ± 0,7	3,0 ± 0,5	3,3 ± 0,5	3,4 ± 0,8	3,9 ± 0,7	<0,001
FGF-23 (rU/ml)	102 (64-164)	62 (46-90)	74 (54-105)	128 (92-195)	179 (140-291)	<0,001
sKlotho (pg/ml)	397 (326-485)	433 (369-581)	412 (344-493)	374 (299-454)	382 (303-459)	0,020
Parathormon (pg/ml)	53 (37-84)	41 (32-54)	44 (32-57)	62 (42-96)	111 (67-162)	<0,001
eGFR (ml/min/1,73m ²)	45 ± 16	68 ± 6	52 ± 4	38 ± 4	22 ± 4	<0,001
Albuminurie (mg/g)	37 (8-193)	26 (7-108)	19 (6-70)	46 (11-164)	129 (37-689)	<0,001
FePi (%)	26 ± 13	17 ± 8	20 ± 9	28 ± 11	40 ± 13	<0,001
BB (%)	301 (68)	45 (51)	97 (76)	96 (66)	63 (77)	0,001

	Gesamt (n=444)	G2 (n=89)	G3a (n=128)	G3b (n=145)	G4 (n=82)	p
ACE-I (%)	165 (37)	26 (29)	60 (47)	43 (30)	36 (44)	0,29
Statin (%)	216 (49)	29 (33)	73 (57)	70 (48)	44 (54)	0,008
Natives Vitamin D ₃ (%)	189 (43)	38 (43)	51 (40)	51 (35)	49 (60)	0,01
Aktives Vitamin D ₃ (%)	33 (7)	1 (1)	1 (1)	14 (10)	17 (21)	<0,001

Angegeben sind Anzahl (Prozentwert) bzw. Mittelwerte \pm Standardabweichung. CRP Spiegel und Albuminurie sind aufgrund fehlender Normalverteilung als Median (Interquartil-Abstand) angegeben. KVE: Kardiovaskuläre Erkrankungen; CRP: C-reaktives Protein; HDL-C: Lipoprotein hoher Dichte; LDL-C: Lipoprotein geringer Dichte; BMI: Body mass index; FGF-23: Fibroblast Growth Factor-23; sKlotho: soluble (lösliches) Klotho; eGFR: estimated (geschätzte) glomeruläre Filtrationsrate; FePi: fraktionelle Phosphatausscheidung im Urin; BB: Beta-Blocker; ACE-I: Angiotensin-Converting Enzym Inhibitoren.

3.1.1 Lösliche Klotho-Plasmaspiegel

Bei der Stratifizierung nach Klotho-Tertilen fällt eine Abnahme der löslichen Klotho-Plasmaspiegel mit zunehmendem Lebensalter und steigenden CRP-Werten auf. Darüber hinaus finden sich keine weiteren signifikanten Unterschiede in den Ausgangscharakteristika dieser drei Gruppen.

Tabelle 5: Baseline Charakteristika der Patienten stratifiziert nach sKlotho-Plasmaspiegeln

	Tertile 1 (n=148) (171-358 pg/ml)	Tertile 2 (n=148) (359-425 pg/ml)	Tertile 3 (n=148) (446-2054 pg/ml)	p
sKlotho (pg/ml)	296 (260-326)	397 (375-425)	565 /484-664)	<0,001
Alter (Jahre)	67 ± 11	65 ± 11	63 ± 11	0,020
Geschlecht weiblich (%)	54 (37)	63 (43)	62 (42)	0,505
Raucher (%)	16 (11)	14 (9)	14 (9)	0,904
Diabetes mellitus (%)	55 (37)	53 (36)	60 (50)	0,688
KVE (%)	51 (34)	41 (28)	43 (29)	0,409
CRP (mg/l)	2,9 (1,4-6,0)	2,9 (1,1-5,6)	2,4 (1,1-4,4)	0,010
Gesamtcholesterin (mg/dl)	195 ± 40	190 ± 40	194 ± 46	0,578
HDL-C (mg/dl)	51 ± 17	53 ± 18	51 ± 17	0,347
LDL-C (mg/dl)	119 ± 34	112 ± 35	116 ± 36	0,158
BMI (kg/m ²)	30 ± 5	30 ± 6	30 ± 6	0,845
Kalzium (mmol/l)	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0,700
Phosphat (mg/dl)	3,5 ± 0,7	3,4 ± 0,8	3,3 ± 0,6	0,235
FGF-23 (rU/ml)	107 (70-193)	103 (60-150)	89 (60-151)	0,848

	Tertile 1 (n=148) (171-358 pg/ml)	Tertile 2 (n=148) (359-425 pg/ml)	Tertile 3 (n=148) (446-2054 pg/ml)	p
Parathormon (pg/ml)	71 ± 55	73 ± 66	68 ± 47	0,701
eGFR (ml/min/1,73m ²)	42 ± 14	46 ± 18	47 ± 15	0,009
Albuminurie (mg/g)	30 (7-177)	27 (6-198)	51 (15-206)	0,327
FePi (%)	26 ± 13	25 ± 13	26 ± 13	0,575
BB (%)	107 (72)	104 (70)	90 (61)	0,078
ACE-I (%)	55 (37)	53 (36)	57 (39)	0,891
Statin (%)	77 (52)	78 (53)	61 (41)	0,085
Natives Vitamin D ₃ (%)	66 (45)	62 (42)	61 (41)	0,824
Aktives Vitamin D ₃ (%)	15 (10)	8 (5)	10 (7)	0,279

Angegeben sind Anzahl (Prozentwert) bzw. Mittelwerte- ± Standardabweichung. CRP Spiegel und Albuminurie sind aufgrund fehlender Normalverteilung als Median (Interquartil-Abstand) angegeben. KVE: Kardiovaskuläre Erkrankungen; CRP: C-reaktives Protein; HDL-C: Lipoprotein hoher Dichte; LDL-C: Lipoprotein geringer Dichte; BMI: Body mass index; FGF-23: Fibroblast Growth Factor-23; sKlotho: soluble (lösliches) Klotho; eGFR: estimated (geschätzte) glomeruläre Filtrationsrate; FePi: fraktionale Phosphatausscheidung im Urin; BB: Beta-Blocker; ACE-I: Angiotensin-Converting Enzym Inhibitoren.

3.1.2 FGF-23-Plasmaspiegel

Nach Analyse der Ausgangscharakteristika stratifiziert nach FGF-23-Plasmaspiegeln zeigte sich eine Assoziation hoher FGF-23-Plasmaspiegel mit zunehmendem Lebensalter, kardiovaskulären Erkrankungen sowie hohen CRP-, Phosphat- und Parathormonspiegeln. Weiterhin zeigte sich mit zunehmender FGF-23-Tertile eine Abnahme der eGFR und HDL-Cholesterin, eine Zunahme der Albuminurie sowie der fraktionellen Phosphatexkretion. Mit steigenden FGF-23-Tertilen war zudem eine zunehmende Häufigkeit der Betablocker- und Vitamin-D₃-Einnahme zu verzeichnen.

Tabelle 6: Baseline Charakteristika der Patienten stratifiziert nach FGF-23-Plasmaspiegeln

	Tertile 1 (n=148) (14,8-72,9 rU/ml)	Tertile 2 (n=148) (73,3-139,3 rU/ml)	Tertile 3 (n=148) (139,8-7441,8 rU/ml)	p
FGF-23 (rU/ml)	53 (41-64)	101 (88-117)	205 (163-337)	<0,001
Alter (Jahre)	62 ± 12	65 ± 14	65 ± 12	<0,001
Geschlecht weiblich (%)	53 (36)	62 (42)	64 (43)	0,381
Raucher (%)	15 (10)	11 (7)	18 (12)	0,393
Diabetes mellitus (%)	47 (32)	56 (38)	65 (44)	0,098
KVE (%)	34 (23)	47 (32)	54 (36)	0,037
CRP (mg/l)	2,3 (1,0-5,1)	2,4 (1,1-4,4)	3,9 (1,4-8,0)	<0,001
Gesamtcholesterin (mg/dl)	194 ± 41	196 ± 43	189 ± 42	0,258
HDL-C (mg/dl)	54 ± 19	51 ± 17	49 ± 16	0,030
LDL-C (mg/dl)	118 ± 35	116 ± 36	116 ± 35	0,501
BMI (kg/m ²)	30 ± 6	30 ± 5	30 ± 6	0,922
Kalzium (mmol/l)	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0,448
Phosphat (mg/dl)	3,2 ± 0,5	3,3 ± 0,8	3,7 ± 0,7	<0,001
sKlotho (pg/ml)	418 (344-550)	384 (339-450)	388 (303-466)	0,069
Parathormon (pg/ml)	48 ± 24	64 ± 41	100 ± 77	<0,001
eGFR (ml/min/1,73m ²)	55 ± 12	47 ± 14	33 ± 13	<0,001
Albuminurie (mg/g)	18 (5-67)	31 (8-150)	100 (22-505)	0,001
FePi (%)	20 ± 9	24 ± 12	33 ± 14	<0,001
BB (%)	81 (55)	109 (74)	111 (75)	<0,001

	Tertile 1 (n=148) (14,8-72,9 rU/ml)	Tertile 2 (n=148) (73,3-139,3 rU/ml)	Tertile 3 (n=148) (139,8-7441,8 rU/ml)	p
ACE-I (%)	48 (32)	63 (43)	54 (36)	0,192
Statin (%)	63 (43)	77 (52)	76 (51)	0,192
Natives Vitamin D ₃ (%)	48 (32)	63 (43)	78 (53)	0,002
Aktives Vitamin D ₃ (%)	2 (1)	4 (3)	27 (18)	<0,001

Angegeben sind Anzahl (Prozentwert) bzw. Mittelwerte \pm Standardabweichung. CRP Spiegel und Albuminurie sind aufgrund fehlender Normalverteilung als Median (Interquartil-Abstand) angegeben. KVE: Kardiovaskuläre Erkrankungen; CRP: C-reaktives Protein; HDL-C: Lipoprotein hoher Dichte; LDL-C: Lipoprotein geringer Dichte; BMI: Body mass index; FGF-23: Fibroblast Growth Factor-23; sKlotho: lösliches (soluble) Klotho; eGFR: estimated (geschätzte) glomeruläre Filtrationsrate; FePi: fraktionale Phosphatausscheidung im Urin; BB: Beta-Blocker; ACE-I: Angiotensin-Converting Enzym Inhibitoren.

3.2 Jährliche Nachbeobachtung

Die durchschnittliche ambulante Nachbeobachtungszeit betrug $2,3 \pm 1,2$ Jahre, kein Patient ging während der Nachbeobachtung verloren. Der definierte kombinierte Endpunkt aus atherosklerotischen Ereignissen / Tod trat bei 81 Patienten (18%) auf, wobei sich bei 70 Patienten ein atherosklerotisches Ereignis eintrat und 11 Patienten an einem nicht-kardialen / nicht-kardiovaskulären Grund verstarben. Bei dem kombinierten Endpunkt aus akuter kardialer Dekompensation / Tod fanden sich Ereignisse bei 47 Probanden, wobei 23 eine akute kardiale Dekompensation erlitten und 24 Probanden ohne vorherige Manifestation einer kardialen Dekompensation verstarben.

Während der Nachbeobachtung unserer CARE FOR HOME Studie stellten sich Alter, vorbestehende Herz-Kreislauferkrankung (CVD), verminderte linksventrikuläre Funktion, CRP, Parathormon, Nierenfunktion (berechnet mit eGFR) und die fraktionale Phosphatausscheidung im Urin als Prädiktoren des ereignisfreien Überlebens dar. Patienten, die ein atherosklerotisches Ereignis erlitten, hatten signifikant häufiger

einen Diabetes mellitus, erhöhte Phosphatspiegel, eine Albuminurie, erniedrigtes Gesamtcholesterin, erniedrigte HDL-C und LDL-C Plasmaspiegel. Das Gesamtcholesterin und Phosphat waren zusätzlich bei den Patienten, welche eine akute kardiale Dekompensation erlitten, im Vergleich zu den Probanden ohne Ereignis signifikant verändert: Das Gesamtcholesterin war bei den Patienten mit Ereignissen niedriger als bei den Patienten ohne Ereignis. Beim Phosphat verhielt es sich umgekehrt, die Patienten mit einem Ereignis wiesen signifikant häufiger einen erhöhten Phosphatspiegel auf. (Tabelle 7)

Tabelle 7: Charakteristika der Studienteilnehmer stratifiziert nach Ereignisstatus

	Atherosklerotische Ereignisse			akute kardiale Dekompensation			Tod		
	Ja (n=70)	Nein (n=374)	p	Ja (n=23)	Nein (n=421)	p	Ja (n=30)	Nein (n=414)	p
Alter (Jahre)	71 ± 8	64 ± 13	<0,001	73 ± 7	65 ± 13	0,002	73 ± 8	65 ± 13	<0,001
Geschlecht weiblich (%)	21 (30)	158 (42)	0,06	7 (30)	172 (41)	0,39	8 (27)	171 (41)	0,13
Raucher (%)	8 (11)	36 (10)	0,66	1 (4)	43 (10)	0,72	3 (10)	41 (10)	>0,99
Diabetes mellitus (%)	39 (56)	129 (34)	0,001	11 (48)	157 (37)	0,39	14 (47)	154 (37)	0,33
KVE (%)	49 (70)	86 (23)	<0,001	14 (61)	121 (29)	0,002	18 (60)	117 (28)	0,001
verminderte LV Funktion (%)	16 (23)	46 (12)	0,03	16 (70)	46 (11)	<0,001	12 (40)	50 (12)	0,001
CRP (mg/l)	4,0 (1,7-8,6)	2,6 (1,1-5,1)	0,008	3,9 (2,4-9,8)	2,7 (1,1-5,1)	0,05	4,2 (2,4-9,6)	2,6 (1,1-4,9)	0,01
Gesamtcholesterin (mg/dl)	177 ± 44	196 ± 41	<0,001	177 ± 36	194 ± 42	0,05	180 ± 40	194 ± 42	0,12
HDL-C (mg/dl)	46 ± 18	52 ± 17	0,002	50 ± 14	52 ± 17	0,71	50 ± 21	52 ± 17	0,35
LDL-C (mg/dl)	104 ± 33	118 ± 35	0,001	105 ± 30	117 ± 36	0,12	110 ± 33	116 ± 36	0,41
BMI (kg/m ²)	30 ± 5	30 ± 6	0,57	32 ± 5	30 ± 5	0,09	29 ± 5	30 ± 5	0,29
Kalzium (mmol/l)	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0,35	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,1	0,91	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0,54
Phosphat (mg/dl)	3,6 ± 0,9	3,3 ± 0,7	0,008	3,9 ± 0,5	3,4 ± 0,7	<0,001	3,6 ± 0,6	3,4 ± 0,7	0,12
Parathormon (pg/ml)	63 (41-110)	52 (37-77)	0,007	101 (62-126)	52 (37-78)	<0,001	91 (62-117)	51 (36-74)	<0,001

	Atherosklerotische Ereignisse			akute kardiale Dekompensation			Tod		
	Ja (n=70)	Nein (n=374)	p	Ja (n=23)	Nein (n=421)	p	Ja (n=30)	Nein (n=414)	p
eGFR (ml/min/1,73m ²)	36 ± 13	47 ± 16	<0,001	33 ± 10	46 ± 16	<0,001	36 ± 15	46 ± 16	0,001
Albuminurie (mg/g)	85 (24-399)	30 (7-155)	0,001	87 (24-179)	32 (7-195)	0,07	88 (26-31)	31 (7-185)	0,005
FePi (%)	33 ± 13	24 ± 13	<0,001	35 ± 10	25 ± 13	<0,001	34 ± 12	25 ± 13	<0,001
BB (%)	56 (89)	245 (66)	0,02	21 (91)	280 (67)	0,01	25 (83)	276 (67)	0,07
ACE-I (%)	31 (44)	134 (36)	0,18	3 (13)	162 (38)	0,01	11 (37)	154 (37)	>0,99
Statin (%)	45 (64)	171 (46)	0,006	15 (65)	201 (48)	0,13	17 (57)	199 (48)	0,45
Natives Vitamin D ₃ (%)	36 (51)	153 (41)	0,12	11 (48)	178 (42)	0,67	15 (50)	174 (42)	0,45
Aktives Vitamin D ₃ (%)	9 (13)	24 (6)	0,08	4 (17)	29 (7)	0,08	4 (13)	29 (7)	0,27

Angegeben sind Anzahl (Prozentwert) bzw. Mittelwerte- ± Standardabweichung. CRP-Spiegel und Albuminurie sind aufgrund fehlender Normalverteilung als Median (Interquartil-Abstand) angegeben. KVE: Kardiovaskuläre Erkrankungen; LV: Linksventrikulär; CRP: C-reaktives Protein; HDL-C: Lipoprotein hoher; LDL-C: Lipoprotein geringer Dichte; BMI: Body mass index; eGFR: estimated (geschätzte) glomeruläre Filtrationsrate; FePi: fraktionelle Phosphatausscheidung im Urin; BB: Beta-Blocker; ACE-I: Angiotensin-Converting Enzym Inhibitoren.

3.3 Prädiktive Eigenschaften von Klotho und FGF-23

Zur Erkennung möglicher prädiktiver Eigenschaften wurden die CARE FOR HOME Probanden anhand der löslichen Klotho und FGF-23-Plasmaspiegel nach Tertilen unterteilt und eine Kaplan-Meier Analyse mit nachfolgender Log-Rank-Testung durchgeführt. Bei Betrachtung der sKlotho-Plasmaspiegel zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des ereignisfreien Überlebens zwischen den drei Tertilen, weder bei dem kombinierten Endpunkt atherosklerotische Ereignisse / Tod (Abbildung a; $p=0,42$), noch bei dem kombinierten Endpunkt akute kardiale Dekompensation / Tod (Abbildung b; $p=0,33$). Im Gegensatz dazu zeigte die Einteilung nach FGF-23 Tertilen einen signifikanten Unterschied in beiden Endpunkten: Sowohl bei dem kombinierten Endpunkt atherosklerotische Ereignisse / Tod (Abbildung c; $p=0,004$), als auch beim kombinierten Endpunkt akute kardiale Dekompensation / Tod (Abbildung d; $p<0,001$) war das Outcome bei Patienten in der dritten im Vergleich zur ersten Tertile schlechter.

Abbildung a: Lösliches Klotho und atherosklerotische Ereignisse / Tod

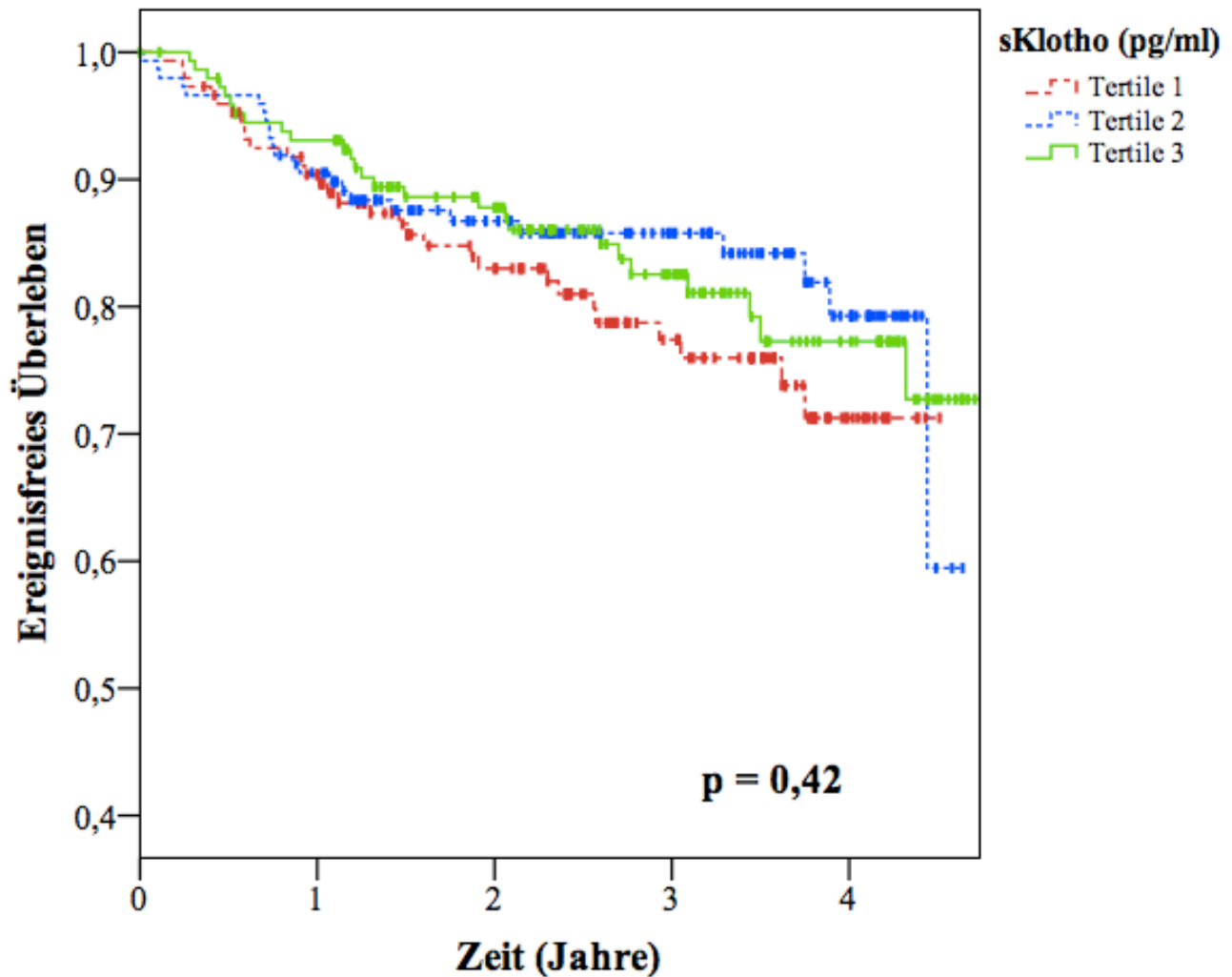


Abbildung a: Lösliches Klotho und ereignisfreies Überleben mit dem kombinierten Endpunkt atherosklerotische Ereignisse / Tod.⁸⁰ Einteilung nach Klotho-Plasmaspiegeln (Tertile 1: 171-358 pg/ml, Tertile 2: 359-444 pg/ml, Tertile 3: 446-2054 pg/ml). Die Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tertilen ($p=0,42$).

Abbildung b: Lösliches Klotho und akute kardiale Dekompensation / Tod

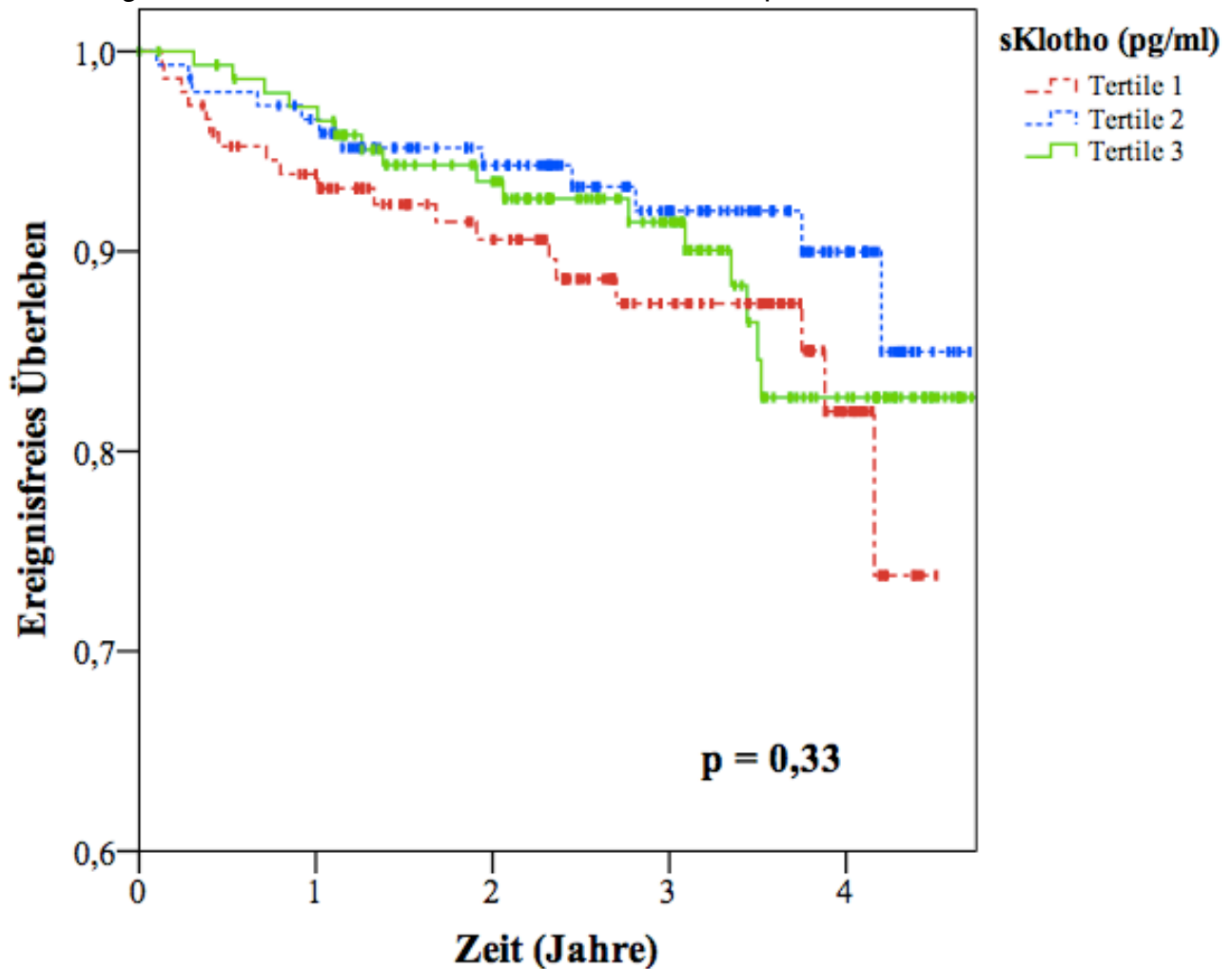


Abbildung b: Lösliches Klotho und Ereignisfreies Überleben mit dem kombinierten Endpunkt akute kardiale Dekompensation / Tod.⁸⁰ Einteilung nach Klotho-Plasmaspiegeln (Tertile 1: 171-358 pg/ml, Tertile 2: 359-444 pg/ml, Tertile 3: 446-2054 pg/ml). Die Kaplan-Meier-Analyse mit log-rank Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tertilen ($p=0,33$).

Abbildung c: FGF-23 und atherosklerotische Ereignisse / Tod

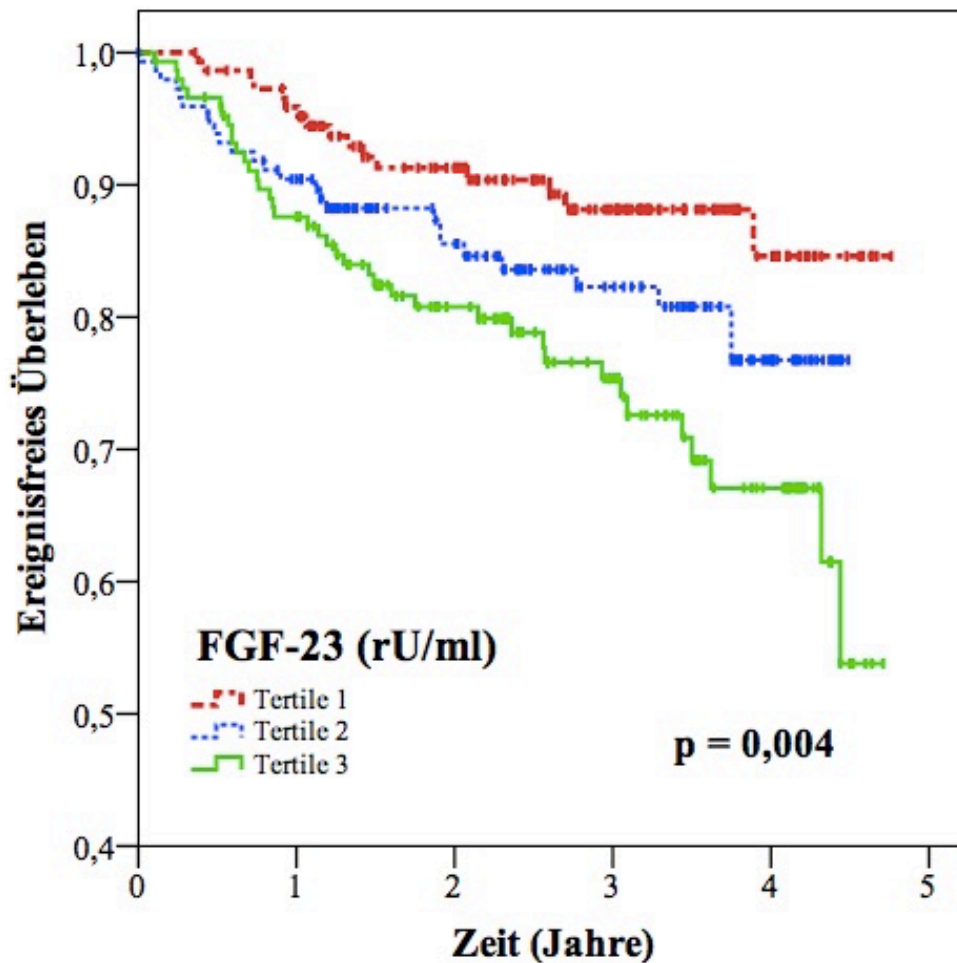


Abbildung c: FGF-23 und ereignisfreies Überleben mit dem kombinierten Endpunkt atherosklerotische Ereignisse / Tod.⁸⁰ Einteilung nach FGF-23-Plasmaspiegeln (Tertile 1: 14,8 – 72,9 rU/ml, Tertile 2: 73,3 – 139,3 rU/ml, Tertile 3: 139,8 – 7441,8 rU/ml). Die Kaplan-Meier-Analyse mit log-rank Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Tertilen ($p=0,004$).

Abbildung d: FGF-23 und akute kardiale Dekompensation / Tod

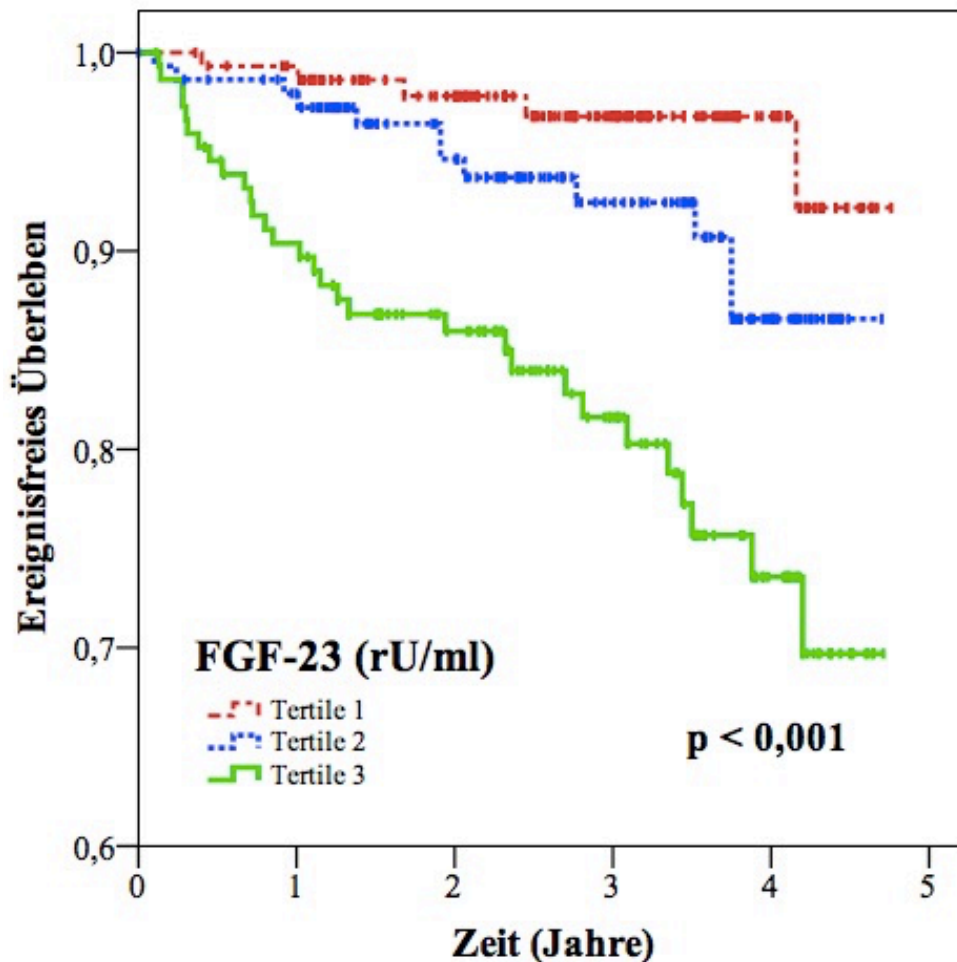


Abbildung d: FGF-23 und ereignisfreies Überleben mit dem kombinierten Endpunkt akute kardiale Dekompensation / Tod.⁸⁰ Einteilung nach FGF-23-Plasmaspiegeln (Tertile 1: 14,8 – 72,9 rU/ml, Tertile 2: 73,3 – 139,3 rU/ml, Tertile 3: 139,8 – 7441,8 rU/ml). Die Kaplan-Meier-Analyse mit log-rank Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Tertilen ($p < 0,001$).

3.4 Cox Regressionsanalyse

In der Cox Regressionsanalyse, durchgeführt für den kombinierten Endpunkt atherosklerotische Ereignisse / Tod (Tabelle 8), waren erhöhte Spiegel von FGF-23, PTH, FePi und Phosphat lediglich in der univariaten Analyse mit einem schlechteren Outcome assoziiert. Für sKlotho traf dies nicht zu, denn bereits in der univariaten Analyse zeigt sich keine prädiktive Wertigkeit von sKlotho für die vordefinierten Endpunkte. Die Cox Regressionsanalyse für den kombinierten Endpunkt akute kardiale Dekompensation / Tod (Tabelle 9) zeigte ebenfalls lediglich in der univariaten Analyse, ein schlechteres ereignisfreies Überleben bei erhöhten Spiegel von PTH, FePi und Phosphat. Diese Marker verloren nach Anpassung für eGFR und Albuminurie ihre statistische Signifikanz.

Hingegen blieb die Assoziation zwischen FGF-23 und dem Endpunkt akute kardiale Dekompensation / Tod auch nach Anpassung für potentielle Störvariablen wie Albuminurie und eGFR bestehen. Auch nach weiteren Korrekturen für Alter, Geschlecht, vorbestehendem Diabetes mellitus und Herz-Kreislaufkrankungen, und schließlich für weitere CKD-MBD Parameter blieb FGF-23 ein statistisch signifikanter Prädiktor für den genannten Endpunkt.

In der multivariaten Analyse zeigte sich eindrucksvoll nach Stratifizierung von FGF-23 in Tertile, dass das Risiko für den kombinierten Endpunkt akute kardiale Dekompensation / Tod bei Probanden in der dritten FGF-23 Tertile mehr als 4-fach höher war im Vergleich zu Probanden in der ersten Tertile (Abbildung e; $p=0,02$).

Tabelle 8: Cox Regressionsanalyse für den kombinierten Endpunkt Atherosklerotische Ereignisse / Tod

	Univariate Analyse			Anpassung für eGFR und In Albuminurie			Anpassung für eGFR, In Albuminurie, Alter und Geschlecht			Anpassung für eGFR, In Albuminurie, Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und KVE			Anpassung für eGFR, In Albuminurie, Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, KVE und CKD-MBD Parameter		
	HR	95% KI	p	HR	95% KI	p	HR	95% KI	p	HR	95% KI	p	HR	95% KI	p
Ln sKlotho (pg/ml)	0,80	0,40-1,58	0,52	0,89	0,45-1,77	0,75	0,84	0,44-1,62	0,61	0,67	0,34-1,34	0,26	0,66	0,33-1,31	0,24
PTH (pg/ml)	1,00	1,00-1,01	0,006	1,00	1,00-1,00	0,94	1,00	1,00-1,00	0,90	1,00	1,00-1,01	0,90	1,00	1,00-1,00	0,95
FePi (%)	1,03	1,02-1,05	<0,001	1,01	0,99-1,03	0,26	1,01	0,98-1,03	0,66	1,00	0,98-1,02	0,93	1,00	0,98-1,03	0,86
Phosphat (mg/dl)	1,31	1,03-1,67	0,03	1,03	0,77-1,37	0,84	1,04	0,77-1,40	0,80	1,13	0,83-1,55	0,44	1,12	0,79-1,58	0,53
Ln FGF-23 (rU/ml)	1,50	1,22-1,85	<0,001	1,18	0,90-1,56	0,24	1,14	0,87-1,50	0,33	1,11	0,86-1,44	0,41	1,11	0,85-1,45	0,46

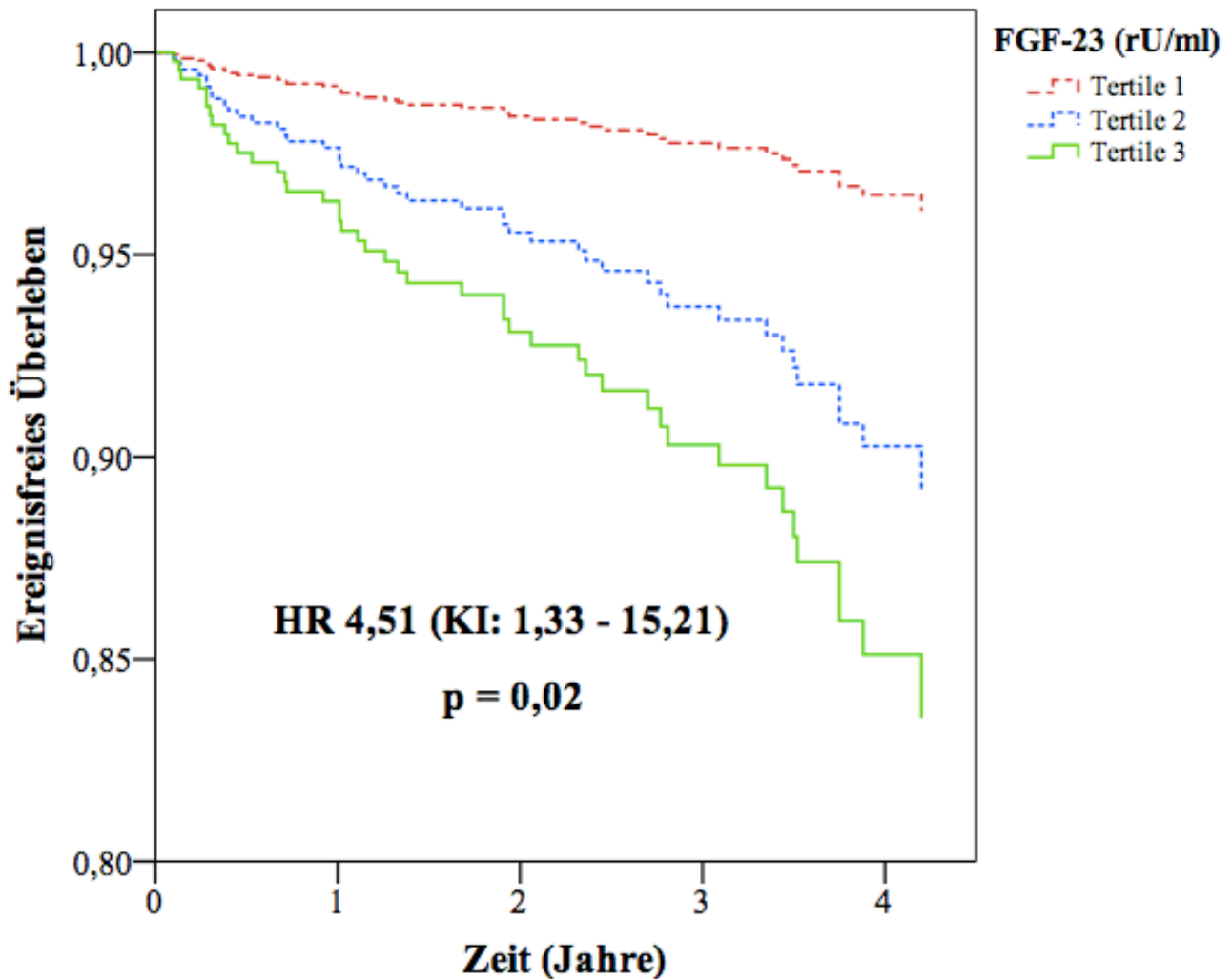
HR: Hazard ratio; KI: Konfidenzintervall; Ln: Logarithmus naturalis; sKlotho: lösliches (soluble) Klotho; PTH: Parathormon; FePi: fraktionelle Phosphatausscheidung im Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor-23; KVE: Kardiovaskuläre Erkrankungen; CKD-MBD: Störungen des Mineral- und Knochenstoffwechsels bei chronischer Nierenerkrankung.

Tabelle 9: Cox Regressionsanalyse für den kombinierten Endpunkt akute kardiale Dekompensation / Tod

	Univariate Analyse			Anpassung für eGFR und In Albuminurie			Anpassung für eGFR, In Albuminurie, Alter und Geschlecht			Anpassung für eGFR, In Albuminurie, Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und KVE			Anpassung für eGFR, In Albuminurie, Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, KVE und CKD-MBD Parameter		
	HR	95% KI	p	HR	95% KI	p	HR	95% KI	p	HR	95% KI	p	HR	95% KI	p
Ln sKlotho (pg/ml)	1,12	0,45-2,73	0,82	1,31	0,53-3,21	0,56	1,20	0,52-2,78	0,67	1,11	0,46-2,67	0,82	1,01	0,41-2,51	0,99
PTH (pg/ml)	1,01	1,02-1,06	<0,001	1,00	1,00-1,01	0,16	1,00	1,00-1,01	0,11	1,00	1,00-1,01	0,05	1,00	1,00-1,01	0,17
FePi (%)	1,04	1,02-1,06	<0,001	1,02	1,00-1,04	0,26	1,01	0,98-1,05	0,42	1,01	0,98-1,04	0,50	1,01	0,97-1,04	0,64
Phosphat (mg/dl)	1,40	1,06-1,84	0,02	1,09	0,76-1,55	0,65	1,08	0,73-1,59	0,72	1,14	0,76-1,70	0,53	1,05	0,64-1,72	0,84
Ln FGF-23 (rU/ml)	2,13	1,66-2,72	<0,001	1,86	1,37-2,54	<0,001	1,71	1,27-2,29	<0,001	1,66	1,24-2,24	0,001	1,60	1,17-2,18	0,003

HR: Hazard ratio; KI: Konfidenzintervall; Ln: Logarithmus naturalis; sKlotho: lösliches (soluble) Klotho; PTH: Parathormon; FePi: fraktionale Phosphatausscheidung im Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor-23; KVE: Kardiovaskuläre Erkrankungen; CKD-MBD: Störungen des Mineral- und Knochenstoffwechsels bei chronischer Nierenerkrankung.

Abbildung e: Hazard Ratio - FGF-23 und ereignisfreies Überleben



Hazard Ratio - FGF-23 und ereignisfreies Überleben.⁸⁰ Einteilung nach FGF-23-Plasmaspiegeln (Tertile 1: 14,8 – 72,9 rU/ml, Tertile 2: 73,3 – 139,3 rU/ml, Tertile 3: 139,8 – 7441,8 rU/ml). Die Hazard Ratio zeigt ein um 4,51 fach signifikant höheres Risiko für Patienten in der höchsten FGF-23 Tertile gegenüber der ersten Tertile ($p=0,02$). KI: Konfidenzintervall.

4. Diskussion

In der vorgelegten Dissertation wurde an einer großen Kohorte chronisch nierenkranker Menschen die Assoziation etablierter Marker der CKD-MBD im Vergleich zu der Assoziation neuer Marker der CKD-MBD, FGF-23 und lösliches Klotho, mit kardiovaskulären Ereignissen untersucht. Kardiovaskuläre Ereignisse wurden als kombinierte Endpunkte atherosklerotische Ereignisse / Tod oder akute kardiale Dekompensation / Tod definiert.

In den vergangenen Jahren wurde der CKD-MBD ein enormer Beitrag in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen bei CKD Patienten zugesprochen: Frühere experimentelle und epidemiologische Studien suggerierten bereits, dass die Hyperphosphatämie, der Hyperparathyroidismus und die Hypovitaminose unabhängige kardiovaskuläre Risikofaktoren darstellen^{18, 81, 82}. Interessanterweise konnte in den interventionellen Studien, die Einnahme von Phosphatbindern, Cinacalcet, oder Vitamin D keine positive Effekte auf Surrogatmarker der CVD ausüben^{16, 83-85} oder gar die kardiovaskuläre Ereignisrate reduzieren⁸⁶.

Trotz dieser vermeintlich negativen Ergebnisse hat die kürzliche Entdeckung der FGF-23 - Klotho Achse das Interesse an der CKD-MBD und deren potentieller Beitrag zur immensen kardiovaskulären Morbidität chronisch nierenkranker Menschen wieder geweckt. Durch die Tatsache, dass FGF-23 und Klotho Knock-out Mäuse eine deutlich akzelerierte vaskuläre Kalzifikation mit deutlich verkürzter Lebensspanne aufweisen^{24, 48}, könnte eine Beeinflussung der FGF-23- und Klotho-Plasmaspiegel eine vielversprechende Therapieoption in der kardio-renalen Medizin darstellen.

Einen Hinweis dafür, dass lösliches Klotho auf das kardiovaskuläre System protektiv wirken könnte, lieferten Hu et al. anhand eines CKD-Tiermodells, in welchem lösliches Klotho die Phosphataufnahme von glatten Gefäßmuskelzellen senkte und somit die Tiere vor vaskulären Kalzifikationen schützte⁶⁷. Lim et al. zeigte an menschlichen Gefäßmuskelzellen der Aorta, dass Urämie zu einer Reduktion der Klotho-Expression und Kalzifizierung der Gefäßmuskelzellen führte, wohingegen eine Steigerung der Klotho-Expression vor extrazellulären Kalziumablagerungen schützte⁶⁹. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Navarro-González et al. brachte ähnliche Ergebnisse. In besagter Studie untersuchte man lösliches Serum-Klotho und die Klotho-

Genexpression in der Gefäßwand der Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK). Hier wurde beobachtet, dass bei Patienten mit relevanter KHK, im Gegensatz zu Patienten mit nicht relevanter KHK (relevant ist definiert als ein Vorliegen von Stenosen $\geq 50\%$ in der Koronarangiographie), ein signifikant niedrigeres lösliches Klotho und eine verminderte Klotho-Genexpression in der Gefäßwand vorlag. Dieser Zusammenhang blieb auch nach Berücksichtigung etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren signifikant.⁸⁷ Zudem zeigte eine weitere tierexperimentelle Studie der Arbeitsgruppe von Hu et al., dass auch das kardiale Remodeling mit Hypertrophie und Fibrose signifikant mit einem niedrigen Klotho-Plasmaspiegel und zudem mit einer Hyperphosphatämie assoziiert ist. Ebenso korrelierten erhöhte FGF-23-Plasmaspiegel mit dem kardialen Remodeling, allerdings nur im Zusammenhang mit niedrigen Plasma Klotho Spiegeln.⁸⁸

Weiterhin wurde vor einigen Jahren ein Allel des Klotho Gens identifiziert (KI-VS), welches in der Normalbevölkerung weit verbreitet ist und, bei Homozygotie, mit einer reduzierten Lebenserwartung assoziiert ist.⁸⁹ Arking et al. zeigten in einer weiteren Studie, dass bei Vorhandensein des KI-VS Allels, das Risiko an einer frühzeitigen KHK bei okkulten Atherosklerose zu erkranken erhöht ist.⁹⁰

Die Ergebnisse der diskutierten Studien suggerieren vaskulo- und kardioprotektive Effekte des löslichen Klotho, die in Diskrepanz zu den Ergebnissen unserer CARE FOR HOME Studie stehen: Wenn diese vaskulo- und kardioprotektiven Effekte aus diesen führend tierexperimentellen Studien für den Menschen relevant wären, dann müssten die CKD Patienten mit hohen löslichen Klotho Spiegeln hypothetisch ein geringeres Risiko für atherosklerotische Ereignisse, akuter kardialer Dekompensation und Tod aufweisen.

In unserer CARE FOR HOME Studie fanden wir keine Beweise um diese Annahme zu stützen. Niedrige sKlotho-Plasmaspiegel waren weder mit einer erhöhten Rate atherosklerotischer Ereignisse, noch mit einer erhöhten Rate von akuter kardialer Dekompensation oder Tod vergesellschaftet. Somit ergänzt unsere Studie rezent publizierte experimentelle Studien, welche weder eine relevante Klotho Expression in glatten Gefäßmuskelzellen⁹¹, noch Klotho-vermittelte Effekte von FGF-23 auf die endotheliale Funktion oder Gefäßkalzifikation zeigten⁹¹. Außerdem wurde die Idee einer protektiven Rolle des löslichen Klotho durch die Inhibition einer aktiven Kalzium und Phosphataufnahme durch glatte Gefäßmuskelzellen widerlegt⁹².

Im Gegensatz zu löslichem Klotho stellte FGF-23 einen Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse in der CARE FOR HOME Studie dar. In der univariaten Analyse wurde bei Patienten mit hohen FGF-23-Plasmaspiegeln eine Assoziation mit atherosklerotischen Ereignissen sowie mit akuter kardialer Dekompensation gezeigt. Allerdings verlor die Assoziation zwischen erhöhten FGF-23-Plasmaspiegeln und atherosklerotischen Ereignissen nach Korrektur für die Nierenfunktion die statistische Signifikanz. Unsere Ergebnisse stehen teilweise im Gegensatz zu denen der HOST Studie, bei welcher akute Myokardinfarkte und periphere Gefäßverschlüsse durch die höchsten Baseline FGF-23 Spiegel vorhergesagt wurden.⁴³ Allerdings waren die meisten HOST Probanden im GFR Stadium G4 mit einer mittleren eGFR von 18 ml/min/1,73 m². Somit waren in der HOST Studie die FGF-23 Spiegel deutlich höher und die interindividuelle Variabilität der Baseline eGFR Spiegel erheblich niedriger als in der CARE FOR HOME Studie. Folglich beeinträchtigte die Anpassung für die eGFR in HOST weniger die Assoziation zwischen FGF-23 und atherosklerotischen Ereignissen. Im Gegensatz zur HOST-Studie ähneln die Charakteristika der Teilnehmer der CRIC Studie eher den Teilnehmern der CARE FOR HOME: Zwar ist die CRIC Studie mit 3860 Probanden deutlich größer als unsere CARE FOR HOME Studie, aber es wurden ebenfalls Patienten im CKD-Stadium 2-4 eingeschlossen. Die neuesten Ergebnisse der CRIC-Studie bestätigen die Ergebnisse der CARE FOR HOME Studie, denn auch in CRIC wurde gezeigt, dass mit zunehmenden FGF-23 Spiegel die Ereignisrate kardialer Dekompensationen signifikant zunahm. Ein Unterschied bestand jedoch darin, dass die Assoziation zwischen erhöhten FGF-23-Plasmaspiegeln und atherosklerotischen Ereignissen, anders als in der CARE FOR HOME Studie, auch nach Anpassung für die Nierenfunktion statistisch Signifikant blieb.⁹³ Erklären ließe sich dies vermutlich durch die höhere Zahl der Probanden und Ereignisse. Wobei man hier, aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse, die klinische Relevanz von FGF-23 und atherosklerotischen Ereignissen anzweifeln kann, da die Assoziation erst bei einer großen Zahl von Probanden und Ereignissen statistische Signifikanz erlangt.

In unserer CARE FOR HOME Studie blieb FGF-23 ein starker, unabhängiger Prädiktor für akute kardiale Dekompensation und Tod, auch nach vollständiger Korrektur für Nierenfunktion, Alter, Geschlecht und andere CKB MBD-Parameter im multivariaten Regressionsmodell. Unsere Ergebnisse werden durch prospektive Untersuchungen an Patienten mit intakter Nierenfunktion gestützt, bei diesen zeigte sich FGF-23

ebenfalls als unabhängiger Prädiktor in multivariaten Analysen für akute kardiale Dekompensation und Tod. Wie in der CARE FOR HOME Studie konnte FGF-23, auch in diesen Untersuchungen, nicht als Prädiktor für klassische atherosklerotische Ereignissen wie beispielsweise Myokardinfarkt fungieren.^{94, 95} Entsprechend wurden 1309 Probanden in der HOM SWEET HOME Studie¹⁸ einer elektiven Koronarangiographie unterzogen, bei welcher sich eine Assoziation zwischen FGF-23 und einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion sowie prävalenten Vorhofflimmern zeigte. Allerdings gab es keinen Zusammenhang zum Vorhandensein und Ausmaß einer koronaren Gefäßerkrankung⁹⁶.

Tierexperimentelle Studien stützen die auf der Grundlage epidemiologischer Daten suggerierten direkten kardiotoxischen FGF-23 Effekte: Faul et al. demonstrierten, dass FGF-23 Injektionen eine linksventrikuläre Hypertrophie durch Klotho-unabhängige Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Weg induzierten. Im Einklang zeigte sich, dass die Entstehung der linksventrikulären Hypertrophie durch Gabe von Pan-FGF-Rezeptorblockern verhindert werden konnte.⁴⁴ Allerdings zeigten Shalhoub et al., dass eine Antikörper vermittelte FGF-23 Blockade nicht vor der Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie schützt.⁹⁷ Der ursächliche Zusammenhang zwischen FGF-23 Exposition und zukünftiger Entstehung einer linksventrikulären Insuffizienz, eine potenzielle langfristige Folge der linksventrikulären Hypertrophie, bleibt bis dato unbewiesen. Agarwal et al. fanden im Einklang mit der uneinheitlichen experimentellen Datenlage in der Heart and Soul Studie anhand von 887 Probanden keinerlei Assoziation zwischen FGF-23 und linksventrikulärer Masse bei Probanden mit erhaltener Nierenfunktion. Einzig für Probanden mit CKD bestand ein starker Zusammenhang zwischen FGF-23 und konzentrischer linksventrikulärer Hypertrophie.⁹⁸

Pöss et al. untersuchten die Auswirkungen von FGF-23 auf die myokardiale Funktion anhand von Patienten im kardiogenen Schock. Sie stellten die Hypothese einer möglichen reversen Kausalität auf, nämlich dass die erhöhten FGF-23-Plasmaspiegel unter Umständen auch Folge einer myokardialen Funktionsstörung sein könnten und nicht deren Ursache. Sie entdeckten zudem, dass FGF-23 einen signifikanten Prädiktor für Mortalität bei Patienten im kardiogenen Schock darstellt.⁹⁹ Eine alternative Hypothese stellten Andrukhova et al. auf: Sie fanden heraus, dass FGF-23 einen direkten Einfluss auf die Membranverfügbarkeit des NaCl-Kotransporters im distalen Tubulus hat. Im

Einklang zeigten sie, dass die renale Na-Reabsorption im distalen Tubulus bei Mäusen mit FGF-23- und Klotho-Mangel reduziert ist. Umgekehrt wurde die FGF-23 Funktion, durch eine Erhöhung der FGF-23 Konzentration, sei es durch Gabe eines rekombinanten FGF-23 oder durch einen endogenen FGF-23 Anstieg, verstärkt. Die Folge war eine erhöhte Na Rückresorption im distalen Tubulus mit daraus resultierender Volumenüberladung, Hypertonie und linksventrikulärer Hypertrophie. Dies könnte die Assoziation von FGF-23 mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko bei CKD Patienten erklären, ohne dass FGF-23 direkt kardiotoxisch wirkt.¹⁰⁰

Derzeit können wir keine Aussage darüber treffen, in wie weit lösliches Klotho die Gewebe-Klotho-Expression widerspiegelt. Dies hätte die Asservierung von Nierenbiopsaten im Rahmen der CARE FOR HOME erfordert, was aber aufgrund des rein observativen Studiendesigns nicht erfolgte. Neue Erkenntnisse lieferten rezent Olauson et al. auf der Jahrestagung der American Society of Nephrology 2014 in Philadelphia (USA). Dort zeigten sie, dass lösliches Klotho im Plasma nicht die Gewebeexpression von Klotho widerspiegelt. Dennoch gehen wir davon aus, dass die meisten extra-renalen Effekte von Klotho durch das zirkulierende lösliche Klotho vermittelt werden, da die Gewebeexpression von Klotho weitgehend auf Niere und Nebenschilddrüse beschränkt ist. Daher sollte die Klotho Expression im Gewebe erwartungsgemäß stärker mit der CKD Progression als mit kardiovaskulärem Outcome assoziiert sein.

Die aktuelle Datenanalyse erweitert unsere vorhergehende Auswertung der CARE FOR HOME Studie in Bezug auf die CKD-Progression, in welcher wir zeigten, dass lösliches Klotho keine prädiktive Wertigkeit bezüglich des renalen Outcomes hat.⁶⁶ Allerdings konnten wir seit dieser Zeit die Studienkohorte um 123 Patienten erweitern, was eine größere Datenbasis und somit eine größere statistische Power zur Folge hat. So zeigte sich nun ein kleiner (wenn auch signifikanter) Abfall der löslichen Klotho-Plasmaspiegel entlang der CKD GFR Stadien, welcher in unserer ersten Analyse nicht ersichtlich war.⁶⁶

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass lösliches Klotho in der CARE FOR HOME Studie nicht mit atherosklerotischen Ereignissen, akuter kardialer Dekompensation oder Tod assoziiert war. Im Gegensatz dazu haben wir die Bedeutung von FGF-23 als starken prädiktiven Biomarker bei CKD Patienten untermauern können. Zusätzlich lieferten wir neue Daten, die atherosklerotische von myokardialen FGF-23 Effekten abgrenzten.

5. Literaturverzeichnis

1. Frei, U, Schober-Halstenberg, H: Nierenersatztherapie in Deutschland, Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. *Quasi Niere, Bundesverband Niere eV, Mainz, 2008.*

2. Vanholder, R, Wanner, C: Annual Report 2011. *ERA-EDTA Registry, Academic Medical Center, Department of Medical Informatics, Amsterdam, 2011.*

3. Collins, A, Foley, R: 2013 USRDS Annual Data Report Volume one. *Atlas of chronic kidney disease in the United States, 2013.*

4. de Jager, DJ, Grootendorst, DC, Jager, KJ, van Dijk, PC, Tomas, LM, Ansell, D, Collart, F, Finne, P, Heaf, JG, De Meester, J, Wetzels, JF, Rosendaal, FR, Dekker, FW: Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis. *The journal of the American Medical Association, 302: 1782-1789, 2009.*

5. Fellstrom, BC, Jardine, AG, Schmieder, RE, Holdaas, H, Bannister, K, Beutler, J, Chae, DW, Chevaile, A, Cobbe, SM, Gronhagen-Riska, C, De Lima, JJ, Lins, R, Mayer, G, McMahon, AW, Parving, HH, Remuzzi, G, Samuelsson, O, Sonkodi, S, Sci, D, Suleymanlar, G, Tsakiris, D, Tesar, V, Todorov, V, Wiecek, A, Wuthrich, RP, Gottlow, M, Johnsson, E, Zannad, F: Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *The New England journal of medicine, 360: 1395-1407, 2009.*

6. Wanner, C, Krane, V, Marz, W, Olschewski, M, Asmus, HG, Kramer, W, Kuhn, KW, Kutemeyer, H, Mann, JF, Ruf, G, Ritz, E: Randomized controlled trial on the efficacy and safety of atorvastatin in patients with type 2 diabetes on hemodialysis (4D study): demographic and baseline characteristics. *Kidney & blood pressure research, 27: 259-266, 2004.*

7. Zannad, F, Kessler, M, Leheret, P, Grunfeld, JP, Thuilliez, C, Leizorovicz, A, Lechat, P: Prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease: results of a randomized trial of fosinopril and implications for future studies. *Kidney International*, 70: 1318-1324, 2006.
8. Cooper, BA, Branley, P, Bulfone, L, Collins, JF, Craig, JC, Fraenkel, MB, Harris, A, Johnson, DW, Kesselhut, J, Li, JJ, Luxton, G, Pilmore, A, Tiller, DJ, Harris, DC, Pollock, CA: A randomized, controlled trial of early versus late initiation of dialysis. *The New England journal of medicine*, 363: 609-619, 2010.
9. Eknoyan, G, Beck, GJ, Cheung, AK, Daugirdas, JT, Greene, T, Kusek, JW, Allon, M, Bailey, J, Delmez, JA, Depner, TA, Dwyer, JT, Levey, AS, Levin, NW, Milford, E, Ornt, DB, Rocco, MV, Schulman, G, Schwab, SJ, Teehan, BP, Toto, R: Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *The New England journal of medicine*, 347: 2010-2019, 2002.
10. Rao, M, Pereira, BJ: Prospective trials on anemia of chronic disease: the Trial to Reduce Cardiovascular Events with Aranesp Therapy (TREAT). *Kidney international Supplement*, 64: 12-19, 2003.
11. Singh, AK, Szczech, L, Tang, KL, Barnhart, H, Sapp, S, Wolfson, M, Reddan, D: Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *The New England journal of medicine*, 355: 2085-2098, 2006.
12. Cozzolino, M, Urena-Torres, P, Vervloet, MG, Brandenburg, V, Bover, J, Goldsmith, D, Larsson, TE, Massy, ZA, Mazzaferro, S: Is chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) really a syndrome? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 29: 1815-1820, 2014.

13. Levin, A, Bakris, GL, Molitch, M, Smulders, M, Tian, J, Williams, LA, Andress, DL: Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney international*, 71: 31-38, 2007.
14. Tentori, F, Blayney, MJ, Albert, JM, Gillespie, BW, Kerr, PG, Bommer, J, Young, EW, Akizawa, T, Akiba, T, Pisoni, RL, Robinson, BM, Port, FK: Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 52: 519-530, 2008.
15. Wald, R, Sarnak, MJ, Tighiouart, H, Cheung, AK, Levey, AS, Eknoyan, G, Miskulin, DC: Disordered mineral metabolism in hemodialysis patients: an analysis of cumulative effects in the Hemodialysis (HEMO) Study. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 52: 531-540, 2008.
16. Raggi, P, Chertow, GM, Torres, PU, Csiky, B, Naso, A, Nossuli, K, Moustafa, M, Goodman, WG, Lopez, N, Downey, G, Dehmel, B, Floege, J: The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26: 1327-1339, 2011.
17. Isakova, T, Gutierrez, OM, Chang, Y, Shah, A, Tamez, H, Smith, K, Thadhani, R, Wolf, M: Phosphorus binders and survival on hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20: 388-396, 2009.
18. Heine, GH, Seiler, S, Fliser, D: FGF-23: the rise of a novel cardiovascular risk marker in CKD. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 27: 3072-3081, 2012.

19. Yamashita, T: Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23. *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*, 9: 313-318, 2005.
20. Riminucci, M, Collins, MT, Fedarko, NS, Cherman, N, Corsi, A, White, KE, Waguespack, S, Gupta, A, Hannon, T, Econs, MJ, Bianco, P, Gehron Robey, P: FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *The Journal of clinical investigation*, 112: 683-692, 2003.
21. Tomlinson, E, Fu, L, John, L, Hultgren, B, Huang, X, Renz, M, Stephan, JP, Tsai, SP, Powell-Braxton, L, French, D, Stewart, TA: Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology*, 143: 1741-1747, 2002.
22. Holt, JA, Luo, G, Billin, AN, Bisi, J, McNeill, YY, Kozarsky, KF, Donahee, M, Wang, DY, Mansfield, TA, Kliewer, SA, Goodwin, B, Jones, SA: Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes & development*, 17: 1581-1591, 2003.
23. Kharitonov, A, Shiyanova, TL, Koester, A, Ford, AM, Micanovic, R, Galbreath, EJ, Sandusky, GE, Hammond, LJ, Moyers, JS, Owens, RA, Gromada, J, Brozinick, JT, Hawkins, ED, Wroblewski, VJ, Li, DS, Mehrbod, F, Jaskunas, SR, Shanafelt, AB: FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation*, 115: 1627-1635, 2005.
24. Shimada, T, Kakitani, M, Yamazaki, Y, Hasegawa, H, Takeuchi, Y, Fujita, T, Fukumoto, S, Tomizuka, K, Yamashita, T: Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *The Journal of clinical investigation*, 113: 561-568, 2004.

25. Goetz, R, Beenken, A, Ibrahimi, OA, Kalinina, J, Olsen, SK, Eliseenkova, AV, Xu, C, Neubert, TA, Zhang, F, Linhardt, RJ, Yu, X, White, KE, Inagaki, T, Kliewer, SA, Yamamoto, M, Kurosu, H, Ogawa, Y, Kuro-o, M, Lanske, B, Razzaque, MS, Mohammadi, M: Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Molecular and cellular biology*, 27: 3417-3428, 2007.
26. Baum, M, Schiavi, S, Dwarakanath, V, Quigley, R: Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules. *Kidney International*, 68: 1148-1153, 2005.
27. Miyamoto, K, Ito, M, Kuwahata, M, Kato, S, Segawa, H: Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*, 9: 331-335, 2005.
28. Shimada, T, Hasegawa, H, Yamazaki, Y, Muto, T, Hino, R, Takeuchi, Y, Fujita, T, Nakahara, K, Fukumoto, S, Yamashita, T: FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 19: 429-435, 2004.
29. Liu, S, Tang, W, Zhou, J, Stubbs, JR, Luo, Q, Pi, M, Quarles, LD: Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17: 1305-1315, 2006.
30. Krajisnik, T, Bjorklund, P, Marsell, R, Ljunggren, O, Akerstrom, G, Jonsson, KB, Westin, G, Larsson, TE: Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *The Journal of endocrinology*, 195: 125-131, 2007.
31. Ben-Dov, IZ, Galitzer, H, Lavi-Moshayoff, V, Goetz, R, Kuro-o, M, Mohammadi, M,

- Sirkis, R, Naveh-Many, T, Silver, J: The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *The Journal of clinical investigation*, 117: 4003-4008, 2007.
32. Burnett-Bowie, SM, Henao, MP, Dere, ME, Lee, H, Leder, BZ: Effects of hPTH(1-34) infusion on circulating serum phosphate, 1,25-dihydroxyvitamin D, and FGF23 levels in healthy men. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 24: 1681-1685, 2009.
33. Gutierrez, OM, Smith, KT, Barchi-Chung, A, Patel, NM, Isakova, T, Wolf, M: (1-34) Parathyroid hormone infusion acutely lowers fibroblast growth factor 23 concentrations in adult volunteers. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 7: 139-145, 2012.
34. Lopez, I, Rodriguez-Ortiz, ME, Almaden, Y, Guerrero, F, de Oca, AM, Pineda, C, Shalhoub, V, Rodriguez, M, Aguilera-Tejero, E: Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney International*, 80: 475-482, 2011.
35. Saji, F, Shigematsu, T, Sakaguchi, T, Ohya, M, Orita, H, Maeda, Y, Ooura, M, Mima, T, Negi, S: Fibroblast growth factor 23 production in bone is directly regulated by 1{alpha},25-dihydroxyvitamin D, but not PTH. *American journal of physiology Renal physiology*, 299: F1212-1217, 2010.
36. Samadfam, R, Richard, C, Nguyen-Yamamoto, L, Bolivar, I, Goltzman, D: Bone formation regulates circulating concentrations of fibroblast growth factor 23. *Endocrinology*, 150: 4835-4845, 2009.
37. Wesseling-Perry, K, Harkins, GC, Wang, HJ, Elashoff, R, Gales, B, Horwitz, MJ, Stewart, AF, Juppner, H, Salusky, IB: The calcemic response to continuous parathyroid hormone (PTH)(1-34) infusion in end-stage kidney disease varies according to bone turnover: a potential role for PTH(7-84). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95: 2772-2780, 2010.

38. Larsson, T, Nisbeth, U, Ljunggren, O, Juppner, H, Jonsson, KB: Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney International*, 64: 2272-2279, 2003.
39. Evenepoel, P, Meijers, B, Viaene, L, Bammens, B, Claes, K, Kuypers, D, Vanderschueren, D, Vanrenterghem, Y: Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 5: 1268-1276, 2010.
40. Isakova, T, Wahl, P, Vargas, GS, Gutierrez, OM, Scialla, J, Xie, H, Appleby, D, Nessel, L, Bellovich, K, Chen, J, Hamm, L, Gadegbeku, C, Horwitz, E, Townsend, RR, Anderson, CAM, Lash, JP, Hsu, C-y, Leonard, MB, Wolf, M: Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney International*, 79: 1370-1378, 2011.
41. Fliser, D, Kollerits, B, Neyer, U, Ankerst, DP, Lhotta, K, Lingenhel, A, Ritz, E, Kronenberg, F, Kuen, E, Konig, P, Kraatz, G, Mann, JF, Muller, GA, Kohler, H, Riegler, P: Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18: 2600-2608, 2007.
42. Gutierrez, OM, Mannstadt, M, Isakova, T, Rauh-Hain, JA, Tamez, H, Shah, A, Smith, K, Lee, H, Thadhani, R, Juppner, H, Wolf, M: Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *The New England journal of medicine*, 359: 584-592, 2008.
43. Kendrick, J, Cheung, AK, Kaufman, JS, Greene, T, Roberts, WL, Smits, G, Chonchol, M: FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis.

Journal of the American Society of Nephrology, 22: 1913-1922, 2011.

44. Faul, C, Amaral, AP, Oskoueï, B, Hu, MC, Sloan, A, Isakova, T, Gutierrez, OM, Aguillon-Prada, R, Lincoln, J, Hare, JM, Mundel, P, Morales, A, Scialla, J, Fischer, M, Soliman, EZ, Chen, J, Go, AS, Rosas, SE, Nessel, L, Townsend, RR, Feldman, HI, St John Sutton, M, Ojo, A, Gadegbeku, C, Di Marco, GS, Reuter, S, Kentrup, D, Tiemann, K, Brand, M, Hill, JA, Moe, OW, Kuro, OM, Kusek, JW, Keane, MG, Wolf, M: FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *The Journal of clinical investigation*, 121: 4393-4408, 2011.

45. Gutierrez, OM, Januzzi, JL, Isakova, T, Laliberte, K, Smith, K, Collierone, G, Sarwar, A, Hoffmann, U, Coglianese, E, Christenson, R, Wang, TJ, deFilippi, C, Wolf, M: Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation*, 119: 2545-2552, 2009.

46. Mirza, MA, Larsson, A, Melhus, H, Lind, L, Larsson, TE: Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population. *Atherosclerosis*, 207: 546-551, 2009.

47. Hu, MC, Shiizaki, K, Kuro-o, M, Moe, OW: Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annual review of physiology*, 75: 503-533, 2013.

48. Kuro-o, M, Matsumura, Y, Aizawa, H, Kawaguchi, H, Suga, T, Utsugi, T, Ohyama, Y, Kurabayashi, M, Kaname, T, Kume, E, Iwasaki, H, Iida, A, Shiraki-Iida, T, Nishikawa, S, Nagai, R, Nabeshima, YI: Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390: 45-51, 1997.

49. Mian, IS: Sequence, structural, functional, and phylogenetic analyses of three glycosidase families. *Blood cells, molecules & diseases*, 24: 83-100, 1998.

50. Matsumura, Y, Aizawa, H, Shiraki-Iida, T, Nagai, R, Kuro-o, M, Nabeshima, Y: Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane

and secreted klotho protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 242: 626-630, 1998.

51. Kurosu, H, Ogawa, Y, Miyoshi, M, Yamamoto, M, Nandi, A, Rosenblatt, KP, Baum, MG, Schiavi, S, Hu, MC, Moe, OW, Kuro-o, M: Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *The Journal of biological chemistry*, 281: 6120-6123, 2006.

52. Farrow, EG, Davis, SI, Summers, LJ, White, KE: Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20: 955-960, 2009.

53. Hu, MC, Shi, M, Zhang, J, Pastor, J, Nakatani, T, Lanske, B, Razzaque, MS, Rosenblatt, KP, Baum, MG, Kuro-o, M, Moe, OW: Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24: 3438-3450, 2010.

54. Kuro-o, M: Klotho in health and disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 21: 362-368, 2012.

55. Cha, SK, Ortega, B, Kurosu, H, Rosenblatt, KP, Kuro, OM, Huang, CL: Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 9805-9810, 2008.

56. Chang, Q, Hoefs, S, van der Kemp, AW, Topala, CN, Bindels, RJ, Hoenderop, JG: The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science (New York, NY)*, 310: 490-493, 2005.

57. John, GB, Cheng, CY, Kuro-o, M: Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney*

Foundation, 58: 127-134, 2011.

58. Cha, SK, Hu, MC, Kurosu, H, Kuro-o, M, Moe, O, Huang, CL: Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Molecular pharmacology*, 76: 38-46, 2009.

59. Hu, MC, Kuro-o, M, Moe, OW: Klotho and chronic kidney disease. *Contributions to nephrology*, 180: 47-63, 2013.

60. Asai, O, Nakatani, K, Tanaka, T, Sakan, H, Imura, A, Yoshimoto, S, Samejima, K, Yamaguchi, Y, Matsui, M, Akai, Y, Konishi, N, Iwano, M, Nabeshima, Y, Saito, Y: Decreased renal alpha-Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int*, 81: 539-547, 2012.

61. Koh, N, Fujimori, T, Nishiguchi, S, Tamori, A, Shiomi, S, Nakatani, T, Sugimura, K, Kishimoto, T, Kinoshita, S, Kuroki, T, Nabeshima, Y: Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochemical and biophysical research communications*, 280: 1015-1020, 2001.

62. Yamazaki, Y, Imura, A, Urakawa, I, Shimada, T, Murakami, J, Aono, Y, Hasegawa, H, Yamashita, T, Nakatani, K, Saito, Y, Okamoto, N, Kurumatani, N, Namba, N, Kitaoka, T, Ozono, K, Sakai, T, Hataya, H, Ichikawa, S, Imel, EA, Econs, MJ, Nabeshima, Y: Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochemical and biophysical research communications*, 398: 513-518, 2010.

63. Akimoto, T, Yoshizawa, H, Watanabe, Y, Numata, A, Yamazaki, T, Takeshima, E, Iwazu, K, Komada, T, Otani, N, Morishita, Y, Ito, C, Shiizaki, K, Ando, Y, Muto, S, Kuro-o, M, Kusano, E: Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. *BMC nephrology*, 13: 155, 2012.

64. Pavik, I, Jaeger, P, Ebner, L, Poster, D, Krauer, F, Kistler, AD, Rentsch, K, Andreisek, G, Wagner, CA, Devuyst, O, Wuthrich, RP, Schmid, C, Serra, AL: Soluble klotho and autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 7: 248-257, 2012.
65. Shimamura, Y, Hamada, K, Inoue, K, Ogata, K, Ishihara, M, Kagawa, T, Inoue, M, Fujimoto, S, Ikebe, M, Yuasa, K, Yamanaka, S, Sugiura, T, Terada, Y: Serum levels of soluble secreted alpha-Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. *Clinical and experimental nephrology*, 16: 722-729, 2012.
66. Seiler, S, Wen, M, Roth, HJ, Fehrenz, M, Flugge, F, Herath, E, Weihrauch, A, Fliser, D, Heine, GH: Plasma Klotho is not related to kidney function and does not predict adverse outcome in patients with chronic kidney disease. *Kidney International*, 83: 121-128, 2013.
67. Hu, MC, Shi, M, Zhang, J, Quinones, H, Griffith, C, Kuro-o, M, Moe, OW: Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22: 124-136, 2011.
68. Zhou, L, Li, Y, Zhou, D, Tan, RJ, Liu, Y: Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/beta-catenin signaling. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24: 771-785, 2013.
69. Lim, K, Lu, TS, Molostvov, G, Lee, C, Lam, FT, Zehnder, D, Hsiao, LL: Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation*, 125: 2243-2255, 2012.
70. Saito, Y, Nakamura, T, Ohyama, Y, Suzuki, T, Iida, A, Shiraki-Iida, T, Kuro-o, M, Nabeshima, Y, Kurabayashi, M, Nagai, R: In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochemical and biophysical*

research communications, 276: 767-772, 2000.

71. Rakugi, H, Matsukawa, N, Ishikawa, K, Yang, J, Imai, M, Ikushima, M, Maekawa, Y, Kida, I, Miyazaki, J, Ogihara, T: Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine*, 31: 82-87, 2007.

72. Levey, AS, Coresh, J, Greene, T, Marsh, J, Stevens, LA, Kusek, JW, Van Lente, F: Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. *Clinical chemistry*, 53: 766-772, 2007.

73. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 39: 1-266, 2002.

74. Levey, AS, Coresh, J, Balk, E, Kausz, AT, Levin, A, Steffes, MW, Hogg, RJ, Perrone, RD, Lau, J, Eknoyan, G: National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine*, 139: 137-147, 2003.

75. Smith, ER, Ford, ML, Tomlinson, LA, Weaving, G, Rocks, BF, Rajkumar, C, Holt, SG: Instability of fibroblast growth factor-23 (FGF-23): implications for clinical studies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 412: 1008-1011, 2011.

76. Fassbender, WJ, Brandenburg, V, Schmitz, S, Sandig, D, Simon, SA, Windolf, J, Stumpf, UC: Evaluation of human fibroblast growth factor 23 (FGF-23) C-terminal and intact enzyme-linked immunosorbent-assays in end-stage renal disease patients. *Clinical laboratory*, 55: 144-152, 2009.

77. Rose, GA: The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys. *Bulletin of the World Health Organization*, 27: 645-658, 1962.

78. Bruning, JL, Kintz, BL: Computational Handbook of Statistics. 1997.
79. Levey, AS, de Jong, PE, Coresh, J, El Nahas, M, Astor, BC, Matsushita, K, Gansevoort, RT, Kasiske, BL, Eckardt, KU: The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney International*, 80: 17-28, 2011.
80. Seiler, S, Rogacev, KS, Roth, HJ, Shafein, P, Emrich, I, Neuhaus, S, Floege, J, Fliser, D, Heine, GH: Associations of FGF-23 and sKlotho with Cardiovascular Outcomes among Patients with CKD Stages 2-4. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 9: 1049-1058, 2014.
81. Heine, GH, Nangaku, M, Fliser, D: Calcium and phosphate impact cardiovascular risk. *European heart journal*, 34: 1112-1121, 2013.
82. Wolf, M: Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney International*, 82: 737-747, 2012.
83. Block, GA, Wheeler, DC, Persky, MS, Kestenbaum, B, Ketteler, M, Spiegel, DM, Allison, MA, Asplin, J, Smits, G, Hoofnagle, AN, Kooienga, L, Thadhani, R, Mannstadt, M, Wolf, M, Chertow, GM: Effects of phosphate binders in moderate CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23: 1407-1415, 2012.
84. Chue, CD, Townend, JN, Moody, WE, Zehnder, D, Wall, NA, Harper, L, Edwards, NC, Steeds, RP, Ferro, CJ: Cardiovascular effects of sevelamer in stage 3 CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24: 842-852, 2013.
85. Thadhani, R, Appelbaum, E, Pritchett, Y, Chang, Y, Wenger, J, Tamez, H, Bhan, I, Agarwal, R, Zoccali, C, Wanner, C, Lloyd-Jones, D, Cannata, J, Thompson, BT, Andress, D, Zhang, W, Packham, D, Singh, B, Zehnder, D, Shah, A, Pachika, A, Manning, WJ, Solomon, SD: Vitamin D therapy and cardiac structure and function in patients

with chronic kidney disease: the PRIMO randomized controlled trial. *The journal of the American Medical Association*, 307: 674-684, 2012.

86. Chertow, GM, Block, GA, Correa-Rotter, R, Drueke, TB, Floege, J, Goodman, WG, Herzog, CA, Kubo, Y, London, GM, Mahaffey, KW, Mix, TC, Moe, SM, Trotman, ML, Wheeler, DC, Parfrey, PS: Effect of cinacalcet on cardiovascular disease in patients undergoing dialysis. *The New England journal of medicine*, 367: 2482-2494, 2012.

87. Navarro-Gonzalez, JF, Donate-Correa, J, Muros de Fuentes, M, Perez-Hernandez, H, Martinez-Sanz, R, Mora-Fernandez, C: Reduced Klotho is associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Heart (British Cardiac Society)*, 100: 34-40, 2014.

88. Hu, MC, Shi, M, Cho, HJ, Adams-Huet, B, Paek, J, Hill, K, Shelton, J, Amaral, AP, Faul, C, Taniguchi, M, Wolf, M, Brand, M, Takahashi, M, Kuro, OM, Hill, JA, Moe, OW: Klotho and Phosphate Are Modulators of Pathologic Uremic Cardiac Remodeling. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26, 2014.

89. Arking, DE, Krebsova, A, Macek, M, Sr., Macek, M, Jr., Arking, A, Mian, IS, Fried, L, Hamosh, A, Dey, S, McIntosh, I, Dietz, HC: Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 856-861, 2002.

90. Arking, DE, Becker, DM, Yanek, LR, Fallin, D, Judge, DP, Moy, TF, Becker, LC, Dietz, HC: KLOTTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *American journal of human genetics*, 72: 1154-1161, 2003.

91. Lindberg, K, Olauson, H, Amin, R, Ponnusamy, A, Goetz, R, Taylor, RF, Mohammadi, M, Canfield, A, Kublickiene, K, Larsson, TE: Arterial klotho expression and FGF23 effects on vascular calcification and function. *PloS one*, 8: e60658, 2013.

92. Scialla, JJ, Lau, WL, Reilly, MP, Isakova, T, Yang, HY, Crouthamel, MH, Chavkin, NW, Rahman, M, Wahl, P, Amaral, AP, Hamano, T, Master, SR, Nessel, L, Chai, B, Xie,

D, Kallem, RR, Chen, J, Lash, JP, Kusek, JW, Budoff, MJ, Giachelli, CM, Wolf, M: Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. *Kidney International*, 83: 1159-1168, 2013.

93. Scialla, JJ, Xie, H, Rahman, M, Anderson, AH, Isakova, T, Ojo, A, Zhang, X, Nessel, L, Hamano, T, Grunwald, JE, Raj, DS, Yang, W, He, J, Lash, JP, Go, AS, Kusek, JW, Feldman, H, Wolf, M: Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25: 349-360, 2014.

94. Ix, JH, Katz, R, Kestenbaum, BR, de Boer, IH, Chonchol, M, Mukamal, KJ, Rifkin, D, Siscovick, DS, Sarnak, MJ, Shlipak, MG: Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study). *Journal of the American College of Cardiology*, 60: 200-207, 2012.

95. Parker, BD, Schurgers, LJ, Brandenburg, VM, Christenson, RH, Vermeer, C, Ketteler, M, Shlipak, MG, Whooley, MA, Ix, JH: The associations of fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Annals of internal medicine*, 152: 640-648, 2010.

96. Seiler, S, Cremers, B, Rebling, NM, Hornof, F, Jeken, J, Kersting, S, Steimle, C, Ege, P, Fehrenz, M, Rogacev, KS, Scheller, B, Bohm, M, Fliser, D, Heine, GH: The phosphatonin fibroblast growth factor 23 links calcium-phosphate metabolism with left-ventricular dysfunction and atrial fibrillation. *European heart journal*, 32: 2688-2696, 2011.

97. Shalhoub, V, Shatzen, EM, Ward, SC, Davis, J, Stevens, J, Bi, V, Renshaw, L, Hawkins, N, Wang, W, Chen, C, Tsai, MM, Cattley, RC, Wronski, TJ, Xia, X, Li, X, Henley, C, Eschenberg, M, Richards, WG: FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *The Journal of clinical investigation*, 122: 2543-2553, 2012.

98. Agarwal, I, Ide, N, Ix, JH, Kestenbaum, B, Lanske, B, Schiller, NB, Whooley, MA,

- Mukamal, KJ: Fibroblast growth factor-23 and cardiac structure and function. *Journal of the American Heart Association*, 3: e000584, 2014.
99. Poss, J, Mahfoud, F, Seiler, S, Heine, GH, Fliser, D, Bohm, M, Link, A: FGF-23 is associated with increased disease severity and early mortality in cardiogenic shock. *European heart journal Acute cardiovascular care*, 2: 211-218, 2013.
100. Andrukhova, O, Slavic, S, Smorodchenko, A, Zeitz, U, Shalhoub, V, Lanske, B, Pohl, EE, Erben, RG: FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO molecular medicine*, 6: 744-759, 2014.

6. Anhang

6.1 Einverständniserklärung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

im Rahmen Ihres ambulanten Besuches in unserer Abteilung laden wir Sie ein, an einer Untersuchung über den Zusammenhang zwischen Entzündungsparametern im Blut, Gefäßverkalkung (Atherosklerose) und chronischer Nierenerkrankung teilzunehmen. Hierzu benötigen wir Ihre Erlaubnis, eine Urinprobe und eine Blutprobe (54 ml) für Laboruntersuchungen zu verwenden. Zusätzlich möchten wir Sie bitten, einen standardisierten Fragebogen zu Risikofaktoren und klinischen Zeichen einer Herz-Kreislaufkrankung durchzuführen. Der Zeitaufwand beträgt etwa 10 Minuten. Schließlich möchten wir gerne bei Ihnen eine ausführliche Ultraschalluntersuchung von Nieren- und Milzdurchblutung, Herzfunktion und Gefäßwänden durchführen, die etwa 60 Minuten dauern wird. Diese Ultraschalluntersuchung ist mit keinerlei Strahlenbelastung verbunden. Innerhalb der ersten 5 Jahre nach dieser Untersuchung möchten wir nochmals mit Ihnen und / oder ihrem betreuenden Arzt jährlich Kontakt aufnehmen, um uns über Ihren Gesundheitszustand zu erkundigen. Darüber hinaus möchten wir Ihnen zu diesen Zeitpunkten noch einmal eine Blutprobe (18 ml) entnehmen und Sie um eine Urinprobe bitten.

Selbstverständlich ist die Teilnahme an dieser Untersuchung für Sie freiwillig. Wenn sie mit der Teilnahme an unserer Untersuchung nicht einverstanden sind, entstehen Ihnen selbstverständlich keinerlei Nachteile in der medizinischen Behandlung.

Für Rückfragen stehen wir Ihnen jederzeit persönlich zur Verfügung.

Mit der Untersuchung bin ich

☐ einverstanden

☐ nicht einverstanden

Homburg, den _____

(Unterschrift)

6.2 Datenschutzerklärung

Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der klinischen Studie folgende, freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, d. h. ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der klinischen Studie teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Prüfung erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronische Datenträgern bei den Prüfarzten der beteiligten Klinik – Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikums des Saarlandes aufgezeichnet werden. Weiterhin erkläre ich mich einverstanden, dass im Rahmen von externen Überprüfungen wie etwa durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes Einsicht in meine Daten gewährt werden kann.
2. Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen die meine personenbezogenen Daten - insbesondere Gesundheitsdaten – gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

Name: _____

Datum: _____

Unterschrift: _____

6.3 Fragebogen kardiovaskuläres Risiko

1. Hatten Sie jemals Schmerzen oder Beschwerden in Ihrem Brustkorb?

☐ Ja

☐ Nein (falls Nein, bitte Fragen 2-9 überspringen, weiter mit Frage 10)

2. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim bergaufgehen oder schnellem Gehen?

☐ Ja

☐ Nein (falls Nein, weiter mit Frage 9)

☐ Ich gehe nicht bergauf und gehe nicht schnell.

3. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

☐ Ja

☐ Nein

4. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?

☐ Ich halte an oder laufe langsamer

☐ Ich laufe weiter (weiter mit Frage 9)

(Bei Benutzung von Nitrospray: „Ich halte an oder laufe langsamer“ ankreuzen)

5. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

☐ Es kommt zu einer Erleichterung

☐ Es kommt zu keiner Erleichterung (weiter mit Frage 9)

6. Wie rasch?

☐ Innerhalb von 10 Minuten

☐ Nicht innerhalb von 10 Minuten (weiter mit Frage 9)

7. Zeigen Sie mir bitte, wo die Schmerzen oder die Beschwerden lokalisiert sind.

☐ Sternum (oberes oder mittleres Drittel)

☐ Sternum (unteres Drittel)

☐ Linksseitige vordere Brustwand

☐ Linker Arm

(alle Angaben notieren)

8. Haben Sie diese Schmerzen oder Beschwerden sonst irgendwo?

☐ Ja (Notieren wo)

☐ Nein

9. Hatten Sie jemals einen schweren Schmerz über die Vorderseite Ihres Brustkorbes der über dreißig Minuten oder länger anhielt?

☐ Ja

☐ Nein

10. Bekommen Sie Schmerzen beim Gehen in einem oder beiden Beinen?

☐ Ja

☐ Nein (falls nein, weiter mit Frage 19)

11. Begann dieser Schmerz jemals beim Stehen in Ruhe oder beim Sitzen?

☐ Ja (falls ja, weiter mit Frage 19)

☐ Nein

12. Wo im Bein empfinden Sie diesen Schmerz?

☐ Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel ein.

☐ Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel nicht ein (weiter Frage 19)

13. Bekommen Sie diesen Schmerz beim bergaufgehen oder schnellem Gehen?

☐ Ja

☐ Nein (falls nein, weiter mit Frage 19)

☐ Ich gehe nicht bergauf und gehe nicht schnell.

14. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

- ☐ Ja
- ☐ Nein

15. Ist der Schmerz jemals während des Gehens verschwunden?

- ☐ Ja (falls ja, weiter mit Frage 19)
- ☐ Nein

16. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?

- ☐ Ich halte an oder laufe langsamer
- ☐ Ich laufe weiter (weiter mit Frage 19)

17. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

- ☐ Es kommt zu einer Erleichterung
- ☐ Es kommt zu keiner Erleichterung (weiter mit Frage 19)

18. Wie rasch?

- ☐ Innerhalb von 10 Minuten.
- ☐ Nicht innerhalb von 10 Minuten

19. Hatten Sie in den letzten zwei Jahren einen Herzinfarkt, eine Bypass-Operation oder eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

- ☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)
- ☐ Nein

19a. Wurden Sie in den letzten 24 Monaten aufgrund einer anderen Herzerkrankung, z B Herzschwäche mit Wassereinlagerungen in Lunge oder Beinen, stationär aufgenommen?

- ☐ Ja, am ...
- ☐ Nein

19b. In welchem Krankenhaus erfolgte die stationäre Behandlung?

20. Hatten Sie in den letzten zwei Jahren einen Schlaganfall mit Beschwerden, die länger als 24 Stunden angehalten haben?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)

☐ Nein

21. Hatten Sie in den letzten zwei Jahren einen Schlaganfall mit Beschwerden, die kürzer als 24 Stunden angehalten haben, oder plötzlichen Sehverlust über weniger als 24 Stunden?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)

☐ Nein

22. Sind Ihre Halsschlagadern in den letzten zwei Jahren operiert oder mittels Katheter aufgedehnt worden?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)

☐ Nein

23. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern in den letzten zwei Jahren mittels Bypass operiert oder aufgedehnt worden (dies umfasst keine Krampfader-OP)?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)

☐ Nein

24. Ist bei Ihnen in den letzten zwei Jahren eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung diagnostiziert worden?

☐ Ja, Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)

☐ Nein

25. Hatten Sie in den letzten 5 Tagen einen akuten Infekt?

☐ Ja, Fieber $>38,5^{\circ}\text{C}$, Details ...

☐ Ja, Fieber $<38,5^{\circ}\text{C}$, Details ...

☐ Nein

26. Haben Sie in den letzten zwei Jahren geraucht?

☐ Ja

☐ Nein (weiter mit Frage 29)

27. Rauchen Sie aktuell?

☐ Ja (weiter mit Frage 29)

☐ Nein

28. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht?

29. Ist bei Ihnen in den letzten zwei Jahren ein Diabetes mellitus diagnostiziert worden?

☐ Ja

☐ Nein (weiter mit Frage 31)

30. Wie ist der Diabetes mellitus behandelt?

☐ Insulin

☐ blutzuckersenkende Tabletten

☐ Diät

31. An wie vielen Tagen der Woche betätigen Sie sich mind. 30 min sportlich in einem Ausmaß, dass Sie ins Schwitzen kommen? (falls „0“, weiter Frage 33a)

32. Welche Sportarten betrieben Sie hierbei mindestens einmal die Woche?

32a. Wie viele Stunden täglich schauen Sie unter der Woche (werktags, Mo-Fr) fern?

32b. Wie viele Stunden täglich schauen Sie am Wochenende (Sa-So) fern?

33a. Waren Sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme über mindestens acht Stunden nüchtern?

☐ Ja

☐ Nein

33b. Wenn Sie das letzte Jahr betrachten, wie viele Gläser Alkohol haben Sie durchschnittlich pro Woche, also von Montag bis Sonntag, getrunken? Wir betrachten 0,35 l Bier, 0,120 l (ein "Achtel") Wein oder 45 ml Spirituosen als ein Glas Alkohol.

Bier ... Gläser

Rotwein ... Gläser

Weißwein ... Gläser

Spirituosen ... Gläser

34. Nehmen Sie regelmäßig (seit mindestens 14 Tagen täglich) oder gelegentlich (mindestens einmal in den letzten 14 Tagen) Medikamente oder Hormonpräparate wie die Pille ein?

☐ Ja

☐ Nein

34a. Wie heißen diese Medikamente oder Hormonpräparate?

35. Hatten Sie jemals einen Knochenbruch?

35a. Wenn ja, bitte schildern Sie uns die Umstände dieses Knochenbruches?

35b. Wo wurde dieser ambulant versorgt?

35c. Wo wurde dieser Stationär versorgt?

36. Mit wem dürfen wir ein einem, drei und fünf Jahren telefonischen Kontakt aufnehmen, um uns nach Ihrem Gesundheitszustand zu erkundigen?

Mit Angehörigen:

☐ Ja Name: ...
 Telefonnummer: ...

☐ Nein

Mit Hausarzt:

☐ Ja Name: ...
 Telefonnummer: ...

☐ Nein

37. War die 24 h Urinsammlung komplett?

Messungen:

- Gewicht: ...kg
- Hüft- Taillienumfang: ...cm
- Umfang Oberarm: ...cm
- Hautfalten:
 - Triceps: ...mm, Biceps: ...mm, Suprailiacal: ...mm, Subskapulär: ...mm
- Blutdruck beidseits nach 5 min Sitzen
 - Rechter Arm: ... / ...mmHg, Linker Arm: ... / ... mmHg
- Dann Raum verlassen und Blutdruckmessgerät automatisch jede Minute messen lassen.
 - 1 min ... / ...mmHg
 - 2 min ... / ...mmHg
 - 3 min ... / ...mmHg

- 4 min ... / ...mmHg
- 5 min ... / ...mmHg
- 6 min ... / ...mmHg
- 7 min ... / ...mmHg
- 8 min ... / ...mmHg

6.4 Fragebogen Follow-up (telefonisch)

Sehr geehrte Frau / Herr,

mein Name ist xxx, ich bin Mitarbeiter des Universitätsklinikums des Saarlandes. Im Jahr 20... haben Sie sich in ambulanter Behandlung der Nephrologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Homburg befunden. Freundlicherweise erlaubten Sie damals gegenüber unseren Mitarbeitern, dass wir Sie erneut kontaktieren dürfen, um Ihnen telefonisch einige Fragen zu Ihrem Gesundheitszustand zu stellen. Haben Sie jetzt Zeit, gemeinsam mit mir diese Fragen zu beantworten?

1. Hatten Sie in den letzten 24 Monaten, also seit dem .../.../20... einen (erneuten) Herzinfarkt?

☐ Ja, am ...

☐ Nein

1a. Wenn ja, in welchem Krankenhaus erfolgte die stationäre Behandlung?

2. Hatten Sie in den letzten 24 Monaten, also seit dem .../.../20... eine (erneute) Bypass-Operation?

☐ Ja, am ...

☐ Nein

2a. Wenn ja, in welchem Krankenhaus erfolgte die Operation?

3. Hatten Sie in den letzten 24 Monaten, also seit dem .../.../20..., eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

☐ Ja, am ...

☐ Nein

3a. Wenn ja, in welchem Krankenhaus erfolgte die Untersuchung?

4. Hatten Sie in den letzten 24 Monaten, also seit dem .../.../20..., einen Schlaganfall mit Störungen des Sprachzentrums, Lähmungen oder Gefühlsverlusten der Gliedmaßen, die länger als 24 Stunden angehalten haben?

☐ Ja, am ...

☐ Nein

☐ (Nein, aber TIA am ...)

4a. Wenn ja, in welchem Krankenhaus erfolgte die Behandlung?

4b. Welche Beschwerden hatten Sie im Rahmen dieses Schlaganfalles?

4c. Wie lange hielten diese Beschwerden an?

5. Sind Ihre Halsschlagadern in den letzten 24 Monaten, also seit dem .../.../20..., operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?

☐ Ja, OP, am ...

☐ Ja, Intervention, am ...

☐ Nein

5a. Wenn ja, in welchem Krankenhaus erfolgte die Operation oder Aufdehnung?

6. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern in den letzten 24 Monaten, also seit dem .../.../20... mittels Bypass operiert oder mittels Katheter aufgedehnt? (Hierbei sind keine Operationen von „Krampfadern“ gemeint!)

- ☐ Ja, OP, am ...; Art der OP ...
- ☐ Ja, Intervention, am ...; Art der Intervention ...
- ☐ Nein

7. Waren sonstige Operationen an den Beinen oder Füßen erforderlich?

- ☐ Ja, Amputation, am ...
- ☐ Nein

8. Wurden Sie in den letzten 24 Monaten, also seit dem .../.../20..., aufgrund einer anderen Herzerkrankung, z B Herzschwäche mit Wassereinlagerungen in Lunge oder Beinen, stationär aufgenommen?

- ☐ Ja, am ...
- ☐ Nein

8a. Wenn ja, in welchem Krankenhaus erfolgte die stationäre Behandlung?

9. Hatten Sie jemals einen Knochenbruch?

9a. Wenn ja, bitte schildern Sie uns die Umstände dieses Knochenbruches?

9b. Wo wurde dieser ambulant versorgt?

9c Wo wurde dieser Stationär versorgt?

10. Ist bei Ihnen in den letzten 24 Monaten, also seit dem .../.../20..., eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung diagnostiziert worden?

11. Wer betreut Sie momentan hinsichtlich Ihrer Nierenerkrankung?

Dr. ... in ...

12. Wann sind das letzte Mal die Nierenwerte (Kreatinin) bestimmt worden?

.../.../20...

13. Wer hat diese Blutentnahme durchgeführt?

Dr. ... in ...

14. Wir würden uns freuen, in den nächsten Wochen nochmals eine nierenfachärztliche Kontrolle bei Ihnen durchzuführen. Sind Sie damit einverstanden? (Nur falls der Arzt kein Nephrologe)

Vielen Dank für Ihre freundliche Mitarbeit. Sofern Sie einverstanden sind, möchten wir Sie gerne in den nächsten Jahren noch einmal kontaktieren.

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung chronische Nierenerkrankung	15
Tabelle 2: Parameter Blutwerte.....	16
Tabelle 3: Spontan- und Sammelurin-Untersuchungsparameter	17
Tabelle 4: Baseline Charakteristika - stratifiziert nach KDIGO-Stadien 2-4	24
Tabelle 5: Baseline Charakteristika der Patienten stratifiziert nach sKlotho-Plasmaspiegeln	26
Tabelle 6: Baseline Charakteristika der Patienten stratifiziert nach FGF-23-Plasmaspiegeln	28
Tabelle 7: Charakteristika der Studienteilnehmer stratifiziert nach Ereignisstatus.....	31
Tabelle 8: Cox Regressionsanalyse für den kombinierten Endpunkt Atherosklerotische Ereignisse / Tod	39
Tabelle 9: Cox Regressionsanalyse für den kombinierten Endpunkt akute kardiale Dekompensation / Tod	40

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung a: Lösliches Klotho und atherosklerotische Ereignisse / Tod	34
Abbildung b: Lösliches Klotho und akute kardiale Dekompensation / Tod.....	35
Abbildung c: FGF-23 und atherosklerotische Ereignisse / Tod	36
Abbildung d: FGF-23 und akute kardiale Dekompensation / Tod	37
Abbildung e: Hazard Ratio - FGF-23 und ereignisfreies Überleben.....	41

9. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACE-I	Angiotensin Converting Enzyme - Inhibitor
ANOVA	Analysis of Variance
Apo A	Apolipoprotein A
Apo B	Apolipoprotein B
AS	Aminosäure
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ASN	American Society of Nephrology
BB	Beta Blocker
BMI	Bodymass Index
bp	Basenpaar
CI	Confidence Intervall
CKD	Chronic Kidney Disease
CKD-MBD	Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorder
CRP	C-Reaktives Protein
CVD	Cardiovascular Disease
CYP	Cytochrom P450
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFR	Geschätzte (estimated) glomeruläre Filtrationsrate
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Essay
Fab	Fragment Antigen Binding
FePi	Fractional Excretion of Phosphate
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish Peroxidase
HS	Heparan Sulfat

IgG	Immunglobulin G
K/DOQI	Kidney Disease Outcome Quality Initiative
kb	Kilobasenpaare
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KHK	Koronare Herz Krankheit
KVE	Kardiovaskuläre Erkrankung
LDL	Low Density Lipoprotein
Ln	Logarithmus naturalis
LV	Linksventrikulär
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
NaCl	Natrium Chlorid
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NT-pro-BNP	N-terminal Prohormone of Brain Natriuretic Peptide
p	P-Wert
PTH	Parathormon
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium Channel
sKlotho	lösliches (soluble) Kotho
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TRPV	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V

10. Publikationen

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift wurden 2014 in der Zeitschrift Clinical Journal of the American Society of Nephrology publiziert.⁸⁰

12. Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Professor Dr. med. Gunnar H. Heine für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich danken. Darüber hinaus verdanke ich ihm jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung.

Ich danke Herrn Professor Dr. med D. Fliser für die Möglichkeit, in der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes promovieren zu dürfen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. med. Sarah Seiler, die mit Ihrer unermüdlichen und freundlichen Art entscheidend an der Entstehung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich möchte auch unserer MTA Marie Blinn danken, die mir jederzeit unterstützend zur Seite stand.

Auch möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Die zahlreichen konstruktiven Abende haben auch zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.